

REGIONALE VERTEILUNG,
ZELLULÄRE LOKALISIERUNG
UND
NEURONALE SPEZIFITÄT
NEUROTROPHISCHER SUBSTANZEN IM ZENTRALNERVENSYSTEM
VON H A U S UND R A T T E

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
an der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Magdalene Seiler
aus Eichstätt

München, April 1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554620_0036

REGIONALE VERTEILUNG,
ZELLULÄRE LOKALISIERUNG
UND
NEURONALE SPEZIFITÄT
NEUROTROPHISCHER SUBSTANZEN IM ZENTRALNERVENSYSTEM
VON M A U S UND R A T T E

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
an der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Magdalene Seiler
aus Eichstätt

München, April 1985

Dissertation abgegeben am : 18. 4. 1985

Sondergutachter : Priv.Do. Dr. M. E. Schwab

1. Berichterstatter : Priv.Do. Dr. D. G. Weiss

2. Berichterstatter : Prof. Dr. C. N. David

Tag der mündlichen Prüfung : 16. 10. 1985

Meinen Eltern gewidmet

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite:

<u>VERWENDETE ABKÜRZUNGEN</u>	1
<u>GESAMTZUSAMMENFASSUNG</u>	2 - 5
 I. <u>EINFÜHRUNG</u>	 6 - 20
1. Neurotrophische Faktoren : Bedeutung in der Embryonalentwicklung des Nervensystems.	6
2. Nervenwachstumsfaktor (NGF) : Eigenschaften und mögliche Wirkungsmechanismen.	13
3. BDNF (=brain-derived neurotrophic factor), ein neuer neurotrophischer Faktor aus dem Schweinehirn	19
 II. <u>NEUROTROPHISCHE AKTIVITÄT IM ADULTEN RATTEN-ZENTRALNERVENSYSTEM</u>	 21 - 45
1. Fragestellung.	21
2. Material und Methoden :	23 - 25
2.1. Herstellung von Gewebeextrakten.	23
2.2. Auftrennung nach Molekulargewicht.	24
2.3. Testsystem für neurotrophische Aktivität (Biotest)	24
3. Ergebnisse	26 - 39
3.1. Regionale Verteilung	26
3.2. Neurotrophische Aktivität im optischen Nerven : von welchem Zelltyp produziert ? . . .	31
3.3. Molekulargewichtsverteilung der neuro- trophischen Aktivität	34
4. Diskussion : Regionales Vorkommen und Charakterisierung neurotrophischer Aktivität im adulten Ratten-Zentralnervensystem	40 - 44
5. Zusammenfassung.	45

III.	<u>LOKALISIERUNG BDNF-IMMUNOREAKTIVER ZELLEN IM ZENTRALNERVENSYSTEM VON MAUS UND RATTE</u>	. . .46 - 86
1.	Einführung und Fragestellung	.46
2.	Material und Methoden.	.48 - 51
2.1.	Verwendete Antikörper.	.48
2.2.	Vorbehandlung der Gewebe	.50
2.3.	Indirekte Immunfluoreszenz	.50
3.	Ergebnisse	.52 - 79
3.1.	Optischer Nerv (adult ; normal und denerviert; postnatale Entwicklung)	.52
3.2.	Rückenmark (adult; postnatal)	.60
3.3.	Cerebellum (adult; postnatal)	.65
3.4.	Andere Hirnregionen (Tectum opticum, Großhirn-Cortex) (adult)	.71
3.5.	Retina (adult; postnatal)	.74
4.	Diskussion	.80 - 85
4.1.	Spezifität des Antikörpers	.80
4.2.	markierte Zelltypen.	.82
4.3.	Korrelation der Färbung mit neuro- trophischer Aktivität	.84
5.	Zusammenfassung.	.86
IV.	<u>BEDEUTUNG DER ERGEBNISSE VON TEIL II UND III</u>	. . .87 - 92
1.	Rolle von Astrozyten bei Entwicklung und Regeneration.	.87
2.	Mögliche physiologische Bedeutung von BDNF . . .	.90

V.	<u>SPEZIFISCHE AUFNAHME UND RETROGRADER TRANSPORT DES NERVENWACHSTUMSFAKTORS (NGF) VOM NEOCORTEX ZU BASALEN VORDERHIRNKERNEN</u>	.93 - 110
1.	Einführung und Fragestellung	.93
2.	Material und Methoden.	.96 - 98
2.1.	Markierung mit ^{125}I	.96
2.2.	Stereotaktische Injektionen.	.96
2.4.	Autoradiographie	.98
3.	Ergebnisse	.99 - 105
3.1.	Injektionsstellen.	.99
3.2.	Markierte Zellen nach Injektion in den frontalen Cortex.	.99
3.3.	Markierte Zellen nach Injektion in den dorsalen anterioren Occipital-Cortex.	102
3.4.	Markierte Zellen nach Injektion in den Hippocampus	105
3.5.	^{125}I -Cytochrom c	105
4.	Diskussion	106 - 109
4.1.	Selektivität von NGF-Aufnahme und -Transport	106
4.2.	Topographische Organisation.	107
4.3.	Physiologische Bedeutung	109
5.	Zusammenfassung.	110
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	111 - 132
	<u>DANKSAGUNG</u>	133
	<u>LEBENS LAUF</u>	134

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

Abkürzungen für Hirnregionen : siehe Fig. 27 (S. 101)

BDNF	= brain-derived neurotrophic factor
BSA	= Rinderserum-Albumin
cAMP	= zyklisches Adenosin-Monophosphat
cDNA	= komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ChAT	= Cholinacetyltransferase
CMF-PBS	= Ca^{++} -, Mg^{++} - freie Phosphat-gepufferte physiol. Kochsalzlösung (siehe II.2.1.; S. 23)
cRNA	= komplementäre Ribonukleinsäure
CNTF	= ciliary neuronotrophic factor
DBH	= Dopamin- β -Hydroxylase
F14HS	= F14-Medium mit 10% Pferdeserum
FCS	= foetales Kälberserum
FITC	= Fluorescein-Isothiocyanat
GFAP	= saures Glia-Filament-Protein
HRP	= Meerrettichperoxidase
HS	= Pferdeserum
IgG	= Immunglobuline (allgem.)
IgM	= Immunglobulin M
kD	= Kilodalton
mab	= monoklonaler Antikörper
NGF	= Nervenwachstumsfaktor
PBS	= Phosphat-gepufferte physiolog. Kochsalzlösung (siehe III.2.3.; S. 50)
SDS	= Natrium-Dodecylsulfat
TH	= Tyrosinhydroxylase
TRITC	= Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat
T.U.	= trophische Einheiten (Def. siehe II.3.1.; S. 26)
UZ	= Ultrazentrifugation
ZNS	= Zentralnervensystem

GESAMTZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit (1.) der regionalen Verteilung, (2.) der zellulären Lokalisierung und (3.) der neuronalen Spezifität von neurotrophischen Substanzen im adulten Zentralnervensystem (ZNS) von Ratte und Maus. Neurotrophische Substanzen, von denen bisher meist Proteine und Peptide untersucht worden sind, bewirken - vor allem während der Embryonalentwicklung und in Zellkultur - das Überleben bestimmter Neuronen.

1. Die Verteilung neurotrophischer Substanzen im ZNS adulter Ratten wurde durch einen Biotest bestimmt, in dem die Überlebenswirkung von Extrakten verschiedener ZNS-Regionen auf dissoziierte sensorische Spinalganglien-Neuronen von 10-12 Tage alten Hühner-Embryonen verglichen wurde. Extrakte von optischen Nerven und Hinterwurzeln des Rückenmarks enthielten signifikant größere Mengen an neurotrophischen Substanzen als Extrakte von Rückenmark oder *Retina*, und diese wiederum mehr als Extrakte von Gesamthirn (alle Extrakte überstände nach Ultrazentrifugation <UZ>). Die neurotrophischen Substanzen im optischen Nerven wurden von Gliazellen, nicht von Nervenzellen produziert. Nach saurer Fällung (30% der Proteine nach UZ) wurde etwa 20% der neurotrophischen Aktivität im optischen Nerven durch eine Proteinfraction vom Molekulargewicht 12 kD verursacht. Das entspricht dem Molekulargewicht von BDNF ("brain-derived neurotrophic factor"), der aus adultem Schweinehirn gereinigt werden kann (Barde *et al.* 1982). 80% der neurotrophischen Aktivität im optischen Nerven wurden durch eine Fraction vom Molekulargewicht 24-26 kD repräsentiert, die einen aktiven Vorläufer von BDNF und/oder einen anderen Faktor enthalten könnte.

2. Zwei monoklonale Antikörper (Ratten-IgM), die BDNF auf Immuno-dot tests erkannten, waren durch Immunisierung einer Ratte mit einer vorgereinigten, mit Glutaraldehyd polymerisierten Fraktion (Barde *et al.* 1982) gewonnen worden. Diese Antikörper erkannten ein leicht denaturiertes Antigen, wie es auf Immuno-dot tests oder auf leicht (mit 0.4% Formaldehyd) fixierten Schnitten vorlag. Einer der Antikörper färbte auf Schnitten von optischen Nerven, Rückenmark, und anderen Hirnregionen von neugeborenen bis adulten Mäusen und adulten Ratten GFAP-positive Astrozyten (GFAP = saures Glia-Filament-Protein, ein Marker für Astrozyten) an, aber auch GFAP-negative Ependymzellen im Rückenmark und die Müller-Gliazellen in der *Retina*. Im *Cerebellum* von neugeborenen Mäusen färbte der Antikörper Bergmann-Gliazellen an, die GFAP erst im Verlauf der postnatalen Entwicklung exprimieren. Die Färbungsintensität und die Dichte gefärbter Zellen waren allgemein am größten in der weißen Substanz, wo fast ausschließlich fibröse Astrozyten markiert wurden. Die Dichte der durch diesen Antikörper gefärbten Strukturen korrelierte in etwa mit dem im Biotest gefundenen Gehalt an neurotrophen Substanzen in den jeweiligen Hirnregionen (siehe 1.). Bis jetzt konnte allerdings noch nicht ausgeschlossen werden, daß dieser Antikörper auf Gewebsschnitten neben BDNF oder einem BDNF-Vorläuferprotein auch ein anderes immunologisch kreuzreaktives Protein erkennt.

3. Der Nervenwachstumsfaktor (NGF) - und wahrscheinlich auch andere neurotrophische Faktoren - wirkt über die Bindung an hochaffine Membranrezeptoren, die nur die auf NGF reagierenden Neuronen besitzen, und die anschließende selektive Aufnahme und den retrograden Transport zum neuronalen Zellkörper.

Mit ^{125}I markierter NGF wurde stereotaktisch in sehr geringen Mengen in den frontalen *Cortex* oder den dorsalen anterioren *Occipital-Cortex* adulter Ratten injiziert. Mit Hilfe von lichtmikroskopischer Autoradiographie konnte dann nachgewiesen werden, daß ^{125}I -NGF ausschließlich von den großen cholinergen Neuronen der *Nucleus basalis*-Region (*) und des Kerns des diagonalen Bandes von *Broca* spezifisch aufgenommen und retrograd transportiert worden war. Nach Injektion von ^{125}I -NGF in den frontalen *Cortex* wurden - nur ipsilateral - die mehr caudalen Teile der *Nucleus basalis*-Region markiert. Dagegen wurden Zellen, die zum dorsalen anterioren *Occipital-Cortex* projizierten, ipsilateral im gesamten Bereich der *Nucleus basalis*-Region gefunden und außerdem ipsi- und kontralateral im vertikalen und horizontalen Teil des Kerns des diagonalen Bandes von *Broca*. Andere Afferenzen zum *Neocortex* (**) blieben immer unmarkiert. Injektion von ^{125}I -Cytochrom c führte nicht zu einer retrograden Markierung von Neuronen in basalen Vorderhirnkernen. Diese hochselektive Aufnahme und der retrograde Transport von ^{125}I -NGF weisen darauf hin, daß auf den cholinergen Neuronen, die zum *Neocortex* projizieren, hochaffine Rezeptoren für NGF vorhanden sind. Die physiologische Bedeutung von NGF im ZNS ist bisher nicht aufgeklärt; es muß jedoch eine spezifische NGF-Wirkung auf diese cholinergen Neuronen angenommen werden.

(*) : Zellen im lateralen präoptischen Kern, im anterioren lateralen *Hypothalamus*-Kern, in der *Substantia innominata*, dem ventralen *Globus pallidus*, und der *Capsula interna*.

(**) : *Locus coeruleus*, *Raphe*-Kern, *Substantia nigra*, *Thalamus*.

Neurotrophische Substanzen wirken im peripheren und im zentralen Nervensystem selektiv auf bestimmte Neuronen, wie am Beispiel von NGF nachgewiesen werden konnte. Ähnliches muß für BDNF erwartet werden, konnte aber bisher (aus methodischen Gründen) nicht gezeigt werden.

I. EINFÜHRUNG

1. Neurotrophische Faktoren : Bedeutung in der Embryonalentwicklung der Nervensystems

Das Zentralnervensystem der höheren Wirbeltiere ist in seiner Struktur und Funktion außerordentlich komplex. Dennoch kann man in seiner Ontogenese einige Hauptentwicklungsprinzipien erkennen :

In der Proliferationsphase werden in vielen Regionen des peripheren und auch des zentralen Nervensystems zunächst mehr Neuronen produziert, als später im adulten Tier in den entsprechenden Regionen vorhanden sind. Ein Teil dieser embryonalen Nervenzellen stirbt dann in einer oft zeitlich scharf umgrenzten - Entwicklungsphase wieder ab. Dieses Phänomen wird als "natürlicher Zelltod" bezeichnet (Hamburger & Levi-Montalcini 1949; siehe auch Berg 1984; Cowan *et al.* 1984; Cunningham 1982; Oppenheim 1981). - Die embryonalen Neuronen bilden Fortsätze aus, finden damit ihre Zielgebiete und bilden dort Synapsen mit anderen Neuronen und/oder mit peripheren Zielorganen (Muskeln etc.) (Coughlin 1984; Katz *et al.* 1983; Landmesser 1980; Purves & Lichtman 1983; Silver *et al.* 1982). Dabei spielen präferentielle Wachstumsrichtungen durch spezifische Substrat-Eigenschaften und/oder chemotrope Faktoren eine wichtige Rolle (Barde *et al.* 1983; Berg 1984; Coughlin 1984; Edelman 1984; Katz & Lasek 1980; Rutishauser 1984; Varon & Adler 1981). Auch diese anfänglichen Faserverbindungen sind nicht endgültig. Für die Ausbildung der endgültigen funktionellen Verschaltungen können

Fasern wieder zurückgezogen und Synapsen eliminiert bzw. stabilisiert werden (Constantine-Paton 1982; Cowan *et al.* 1984; Purves & Lichtman 1983). - Schließlich differenziert sich jede Nervenzelle zu einem Neuron mit einem jeweils ganz spezifischen Transmittertypus (I.B.Black *et al.* 1984; Patterson 1978; Varon & Adler 1981).

All diese Entwicklungsphasen laufen oft nicht nach einem festen, in den Nervenzellen genetisch fixierten Programm ab, sondern unterliegen regulatorischen Einflüssen benachbarter Zellen und Gewebe. Viele dieser Einflüsse werden von löslichen, teilweise noch nicht näher charakterisierten Substanzen, die oft als "Faktoren" bezeichnet werden, vermittelt (Berg 1984; Cowan *et al.* 1984; Varon & Adler 1981).

Am besten bekannt sind bisher die Mechanismen, die das selektive Überleben von Neuronen im Lauf ihrer Entwicklung bestimmen (Barde *et al.* 1983; Berg 1984; Cowan *et al.* 1984; Cunningham 1982; Thoenen & Barde 1980; Varon & Adler 1981; Varon & Bunge 1978). Experimentelle Embryologen haben schon Anfang des Jahrhunderts (Detwiler 1920; Hamburger 1934, 1939) festgestellt, daß die Zahl von Neuronen in sensorischen und sympathischen Ganglien oder auch in motorischen Kernen des Rückenmarks durch Vergrößerung oder Verkleinerung ihres Innervationsfeldes manipuliert werden kann (Hollyday & Hamburger 1976; Landmesser & Pilar 1976). Später wurden diese Ergebnisse durch Zellkulturexperimente untermauert (siehe als *Review*: Barde *et al.* 1983; Berg 1984; Varon & Adler 1981). So schloß man auf die Existenz neurotrophischer Faktoren.

Neurotrophische Faktoren sind definitionsgemäß lösliche Substanzen, meist Peptide oder Proteine, die schon in sehr geringen Konzentrationen (nM) das Überleben bestimmter Neuronen *in vivo* (z.B. während der Zeit des "natürlichen Zelltods" im Embryo) und *in vitro* bewirken (Barde *et al.* 1983; Berg 1984; Cowan *et al.* 1984; Varon & Adler 1981).

Eine Reihe verschiedener Untersuchungsmethoden wurden zur Erforschung neurotrophischer Faktoren eingesetzt. Als Testsystem für neurotrophische Aktivität wurden zunächst ganze Embryonen (Levi-Montalcini & Hamburger 1951, 1953) und Ganglienexplantate verwendet (Fenton 1970; Levi-Montalcini *et al.* 1954). Um die Einflüsse nicht-neuronaler Zellen auf das Überleben von Neuronen auszuschließen, sind jedoch reine Kulturen bestimmter Neuronen am besten geeignet, deren Überleben nach einer bestimmten Zeit in Kultur überprüft wird (Auszählen überlebender Neuronen) (Barde *et al.* 1983). Dabei gilt, daß viele Nervenzell-Typen ohne bestimmte neurotrophische Faktoren *in vitro* überhaupt nicht am Leben erhalten werden können (Barde *et al.* 1983; Berg 1984; Harper & Thoenen 1981; Thoenen & Barde 1980; Varon & Adler 1981). An solchen Testsystemen können Gewebeeextrakte und schließlich gereinigte Proteine auf ihre neurotrophische Wirkung hin untersucht werden (Barde *et al.* 1983; Berg 1984; Varon & Adler 1981). Dosis-Wirkungs-Beziehungen geben Auskunft über die spezifische Aktivität eines bestimmten Faktors, und damit Hinweise auf das mögliche Vorhandensein eines Hoch-Affinitäts-Rezeptors für den Faktor (Rohrer *et al.* 1983). Um herauszufinden, welche nicht-neuronalen Zellen neurotrophische Aktivitäten produzieren, kann man Neuronen zusammen mit Gewebeeplantaten oder bestimmten nicht-neuronalen Zellen kultivieren, bzw. von nicht-neuronalen

Zellen konditionierte Medien oder Substrate an Neuronen testen (siehe als *Review*: Barde *et al.* 1983; Berg 1984; Varon & Adler 1981; Varon & Sojmen 1979; und auch : Varon *et al.* 1981).

Mit Hilfe dieser Methoden ließen sich mittlerweile eine Reihe neurotrophischer Aktivitäten herausfinden und teilweise charakterisieren (siehe Barde *et al.* 1983; Berg 1984; Varon & Adler 1981), von denen sowohl periphere als auch zentrale Neuronen im Lauf ihrer Entwicklung abhängig sein können.

Ein direkter Nachweis eines gereinigten neurotrophischen Proteins ist möglich, wenn geeignete spezifische Antikörper vorhanden sind, die die biologische Aktivität des Faktors blockieren können, oder die das Vorhandensein des Faktors in Geweben durch Immunoblots oder durch Immunfluoreszenz bzw. Immunhistochemie nachweisen lassen (Reichardt 1984). So kann man feststellen, welche Neuronen-Typen zu einem bestimmten Zeitpunkt der Embryonalentwicklung auf einen bestimmten Faktor angewiesen sind und wo dieser Faktor produziert wird (Barde *et al.* 1983; Berg 1984).

Neurotrophische Aktivitäten werden einerseits vom zu innervierenden Zielorgan produziert und dann von den Nervenendigungen aufgenommen und retrograd transportiert (Aguilar *et al.* 1973; Schwab & Thoenen 1983). So enthält beispielsweise Skelettmuskelextrakt bzw. von Muskelzellen konditioniertes Medium Substanzen, die das Überleben von Motoneuronen im Rückenmark, aber auch von Ciliarganglien-Neuronen bewirken (Bennett *et al.* 1980; Hill & Bennett 1983; Longo *et al.* 1982; Schnaar & Schaffner 1981). Andererseits aber werden neurotrophische Substanzen *in vitro* von Gliazellen (Schwann-Zellen, Astrozyten) (Banker 1980; Eagleson *et al.* 1985; Lindsay 1979; Lindsay *et al.* 1982; Longo *et al.* 1982; Müller *et al.* 1984; Sensenbrenner *et al.* 1980; Varon *et al.* 1981, 1984; Whatley *et al.* 1981) bzw. deren Tumor-Abkömmlingen (z.B. Schwannom- oder C 6 Gliom-Zellen) produziert (Arenander & DeVellis 1982; Barde *et al.* 1978, 1980; Edgar *et al.* 1981; Longo *et al.* 1982; Manthorpe *et al.* 1983; Murphy *et al.* 1977). Das weist darauf hin, daß neurotrophische Aktivitäten, die in Extrakten von zentralem oder peripherem Nervengewebe gefunden wurden (z.B. Barde *et al.* 1982; Lindsay & Tarbit 1979; M.Schwartz *et al.* 1982; Turner *et al.* 1983), wahrscheinlich auch *in vivo* von Gliazellen produziert werden (Barde *et al.* 1983). Ein direkter Austausch von Proteinen zwischen Gliazellen und Axonen konnte *in vivo* bei Invertebraten eindeutig nachgewiesen werden (Bittner 1981; Tytell & Lasek 1984; siehe König 1984 als *Review*).

Trotz der Vielzahl von Quellen neurotrophischer Aktivitäten sind neurotrophische Faktoren im Organismus nur in geringen Mengen vorhanden, gerade weil sie in äußerst geringen Konzentrationen wirken (Barde *et al.* 1983). Daher konnten bisher nur drei Proteine mit spezifischen neurotrophischen Eigenschaften vollständig gereinigt und biochemisch charakterisiert werden :

- NGF (Nervenwachstumsfaktor oder *nerve growth factor*) (Greene & Shooter 1980; Guroff 1983; Harper & Thoenen 1980, 1981; Thoenen & Barde 1980),
- BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (Barde *et al.* 1982, 1983; Berg 1984), und
- CNTF (ciliary neuronotrophic factor) (Barbin *et al.* 1984).

Alle drei Faktoren haben eine unterschiedliche Spezifität für verschiedene Neuronentypen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 : Eigenschaften von NGF, BDNF, und CNTF

Faktor :	NGF ^{a)} (<i>nerve growth factor</i>)	BDNF ^{b)} (<i>brain-derived neurotrophic factor</i>)	CNTF ^{c)} (<i>ciliary neuronotrophic factor</i>)
Quartärstruktur :	Homodimer	Monomer	Monomer
Molekulargewicht :	13.5 kD (Monomer)	12.3 kD	20.4 kD (Monomer)
Isoel. Pkt. :	9.3	10.3	5.0
Quelle :	Speicheldrüse (männl. Maus)	Schweine- hirn	Hühnerembryo- augen
(Überlebens-) Wirkung auf (<u>Neuron-Typen ;</u>)			
sympathische N.	+	-	+ ^{d)}
parasympathische N. (Ciliargangl.)	-	-	+ ^{d)}
sensorische N. (Spinalgangl.)	+	+	+ ^{d)}
<i>Gangl. nodosum</i>	-	+	-
<i>Retina</i> -Ganglien-Z.	-	+	?
Motoneuronen (Rückenmark)	-	-	?

^{a)}: Barde *et al.* 1980; Berg 1984; Greene & Shooter 1980; Guroff 1983; Harper & Thoenen 1980, 1981; Thoenen & Barde 1980;

^{b)}: Barde *et al.* 1980, 1982, 1983; Barde, pers. Mitteilungen; Berg 1984;

^{c)}: Barbin *et al.* 1984; Berg 1984;

^{d)}: Die spezifische Aktivität von CNTF war für sensorische Neuronen geringer als für parasympathische und sympathische Neuronen, d.h. es mußte mehr Faktor eingesetzt werden, um denselben Effekt zu erzielen (Barbin *et al.* 1984).

2. Nervenwachstumsfaktor (NGF) : Eigenschaften und mögliche Wirkungsmechanismen

NGF-artige neurotrophische Aktivität ist seit dem Ende der 40er Jahre bekannt (Bueker 1948; Hamburger & Levi-Montalcini 1951, 1953). NGF kann in großen Mengen als Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 26 kD (β -NGF-Homodimer) aus der Speicheldrüse der adulten männlichen Maus gereinigt werden, wo er als sekretorisches Protein in sehr hohen Konzentrationen vorliegt (Bocchini & Angeletti 1969; Cohen 1960). Immunologisch von Maus-NGF unterscheidbare, aber in ihrer biologischen Aktivität identische (Harper *et al.* 1983) Nervenwachstumsfaktoren wurden außerdem in größeren Mengen aus Schlangengift (Hogue-Angeletti & Bradshaw 1979), und aus der Samenflüssigkeit von Rindern, Kaninchen und Meerschweinchen isoliert (Harper & Thoenen 1980; Harper *et al.* 1983).

NGF wirkt im peripheren Nervensystem spezifisch auf sympathische und sensorische Neuronen. Während der normalen Entwicklung des Nervensystems (Hamburger *et al.* 1981) und im adulten Tier (Heumann *et al.* 1984; Korsching & Thoenen 1983a; Korsching, unveröffentlichte Ergebnisse; Shelton & Reichardt 1984) wird NGF in begrenzter Menge von den Zielorganen NGF-abhängiger Neuronen produziert. Möglicherweise können während der Entwicklung diese Gewebe dadurch ihre Innervationsdichte durch das sympathische und sensorische Nervensystem regulieren (Ebendal *et al.* 1983; Heumann *et al.* 1984; Korsching & Thoenen 1983a; Shelton & Reichardt 1984). Von außen zusätzlich zugeführter NGF vermehrt *in vivo* bei Hühner-Embryonen und neugeborenen Ratten und Mäusen die Anzahl überlebender

sympathischer und sensorischer Neuronen, indem der "natürliche Zelltod" in diesen Ganglien verhindert wird (Hamburger *et al.* 1981; Hendry 1977; Hendry & Campbell 1976; Kessler & Black 1980a; Oppenheim 1981; Thoenen *et al.* 1971). Zusätzlich bewirkt NGF in den entsprechenden Ganglien eine erhöhte Synthese von spezifischen transmitterproduzierenden Enzymen (Tyrosinhydroxylase und Dopamin- β -Hydroxylase im sympathischen Nervensystem) (Levi-Montalcini *et al.* 1975; Otten *et al.* 1977; Rohrer *et al.* 1978; Thoenen *et al.* 1971) bzw. von Neuropeptiden (im sensorischen Nervensystem) (Hayashi *et al.* 1985; Kessler & Black 1980b; Miller *et al.* 1980; Otten & Lorez 1983). Gleichzeitig führt NGF zu einer Hyperinnervation von Zielgebieten NGF-abhängiger Neuronen (Bjerre *et al.* 1975a; Thoenen *et al.* 1971). Entsprechend verursacht NGF *in vitro* neben dem Überleben auch noch ein Auswachsen von Neuriten (Campenot 1977, 1982; Fenton 1970; Letourneau 1978), bewirkt unmittelbar ein fingerförmiges Ausbreiten des "growth cone" (d.h. des auswachsenden Neuritenendes) (Seeley & Greene 1983), und eine Induktion spezifischer transmitterproduzierender Enzyme (z.B. Chun & Patterson 1977; Hefti *et al.* 1982; siehe als *Review*; Greene & Shooter 1980; Thoenen & Barde 1980). Die letzteren Effekte können auch bei Zellen auftreten, die NGF nicht zum Überleben benötigen, aber auch auf NGF ansprechen, wie z.B. die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks (Aloe & Levi-Montalcini 1979; Otten *et al.* 1977; Unsicker *et al.* 1978) oder PC12-Phäochromocytom-Tumorzellen (Greene 1977; Greene & Rukenstein 1981; Hatanaka 1983; siehe als *Review*; Greene & Shooter 1980; Thoenen & Barde 1980).

Durch Gabe von NGF-Antikörpern ließen sich bei embryonalen und bei jungen postnatalen Nagern oder Katzen NGF-abhängige sympathische oder sensorische Neuronen ausschalten (Aloe *et al.* 1981; Gorin & Johnson 1979; Johnson *et al.* 1980; Kessler & Black 1980a; Levi-Montalcini & Angeletti 1966; Schucker 1972). Beispielsweise verursacht Injektion von NGF-Antikörpern in neugeborene Mäuse und Ratten Immunosympathektomie (= Zerstörung des sympathischen Nervensystems) (Goedert *et al.* 1978, 1980; Gorin & Johnson 1979; Levi-Montalcini & Angeletti 1966; Schucker 1972). Diese Resultate zeigten die große physiologische Bedeutung von NGF für die Entwicklung des peripheren Nervensystems.

Die Entwicklungsphase, in der verschiedene Neuronentypen auf NGF unbedingt angewiesen sind, ist unterschiedlich. Das sympathische Nervensystem der Ratte reagiert im Erwachsenenalter auf NGF-Entzug mit einem starken Abfall der Enzyme Tyrosinhydroxylase und Dopamin- β -Hydroxylase und einer langsameren Atrophie (Bjerre *et al.* 1975b; Goedert *et al.* 1978; Gorin & Johnson 1980; siehe als *Review* : Thoenen & Barde 1980). Dagegen läßt sich das sensorische Nervensystem (Spinalganglien) nur durch Einwirkung von NGF-Antikörpern auf den Embryo zerstören (Aloe *et al.* 1981; Goedert *et al.* 1984; Gorin & Johnson 1979; Johnson *et al.* 1980, 1983). Postnatal haben NGF-Antikörper aber ähnliche Effekte auf die Transmitterproduktion (Substanz P) in sensorischen Ganglien (Gorin & Johnson 1980; J.P.Schwartz *et al.* 1982). – Beim Hühnchen konnte gezeigt werden, daß sensorische Neuronen in Kultur mindestens bereits vom 6. embryonalen Tag (E 6) an NGF zum Überleben benötigen. Der maximale Effekt von NGF wird am 10. embryonalen Tag erreicht. Nach E 12 nimmt die Abhängigkeit der Neuronen von NGF

wieder ab und ist am 16. embryonalen Tag fast ganz verschwunden (Barde *et al.* 1980; Barde *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse).

NGF wird von den Zielorganen NGF-abhängiger Neuronen produziert (Heumann *et al.* 1984; Korsching & Thoenen 1983a; Shelton & Reichardt 1984). Welche Zelltypen den NGF produzieren, ist noch unbekannt; es gibt nur vorläufige Hinweise (Bandtlow *et al.* 1984; vgl. Harper & Thoenen 1980; Thoenen & Barde 1980). NGF wird in den Extrazellulärraum abgegeben und bindet dann an hochaffine Rezeptoren auf der Zellmembran der Nervenendigungen (Claude *et al.* 1982; Frazier *et al.* 1974; Rohrer & Barde 1982; Stach & Rusenko 1984; Sutter *et al.* 1979). Nur Zellen, die auf NGF reagieren, haben solche hochaffinen NGF-Rezeptoren (Dumas *et al.* 1979; Herrup & Shooter 1975; Rohrer & Barde 1982; Rohrer *et al.* 1983; Stöckel *et al.* 1974, 1975; siehe als *Review*: Schwab *et al.* 1981; Thoenen & Barde 1980). Bei Neuronen in Zellkultur treten sofort nach der Bindung von NGF an den Rezeptor kurzfristige NGF-Wirkungen auf (z.B. fingerförmiges Ausbreiten *<membrane ruffling>* des "growth cone" *<d.h. des Neuritenendes>*) (Seeley & Greene 1983).

Nach der Bindung wird NGF durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in Vesikel aufgenommen. Die NGF-enhaltenden Vesikel werden dann retrograd zum Zellkörper transportiert (Brunso-Bechtold & Hamburger 1979; Claude *et al.* 1982; Dumas *et al.* 1979; Hendry *et al.* 1974; Johnson *et al.* 1978; Korsching & Thoenen 1983b; Stöckel *et al.* 1974, 1975; siehe als *Review*: Schwab *et al.* 1981; Schwab & Thoenen 1983). Dort entfaltet NGF über einen noch unbekannten *second messenger* (nicht cAMP) seine längerfristigen Wirkungen auf die Proteinsynthese (Frazier

et al. 1973; Hatanaka *et al.* 1978; Heumann *et al.* 1981; Rohrer *et al.* 1978) und bewirkt dadurch einerseits das Überleben und andererseits eine erhöhte Produktion transmitterspezifischer Enzyme in den entsprechenden Neuronen (s.o.).

Mit Hilfe der spezifischen Rezeptor-vermittelten Aufnahme und des retrograden Transports von radioaktiv markiertem NGF lassen sich Neuronen mit hochaffinen NGF-Rezeptoren nachweisen (Dumas *et al.* 1979; Stöckel *et al.* 1974, 1975). Dies konnte sowohl für sympathische als auch für sensorische Neuronen des peripheren Nervensystems gezeigt werden (Stöckel *et al.* 1975). Für das Zentralnervensystem der Ratte konnte nachgewiesen werden, daß radioaktiv markierter NGF nach Injektion in den *Hippocampus* ausschließlich von den Nervenendigungen cholinergischer Neuronen aufgenommen und in die großen Zellkörper im medialen *Septum*-Kern und dem Kern des diagonalen Bandes von *Broca* transportiert wird (Schwab *et al.* 1979). Weder die zentralen Amin-Systeme (*Locus coeruleus*, *Raphe*-Kern, *Substantia nigra*) noch andere Afferenzen zum *Hippocampus* (z.B. *Entorhinaler Cortex*) wurden durch NGF retrograd markiert (Schwab *et al.* 1979). Später konnten Gnahn *et al.* zeigen, daß die Injektion von NGF in Gehirne von neugeborenen Ratten eine Induktion des Acetylcholin produzierenden Enzyms Cholinacetyltransferase (CHAT) in den cholinergen *Septum*-Kernen bewirkte (Gnahn *et al.* 1983).

So stellte sich die Frage, ob NGF auch von den anderen cholinergen Systemen des ZNS spezifisch aufgenommen und retrograd transportiert wird, d.h. ob solche Neuronen hochaffine NGF-Rezeptoren besitzen. Als Teil dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, welche Neuronen nach Injektion von radioaktiv markiertem NGF in den *Neocortex* markiert werden (siehe Teil V).

"Natürlicher Zelltod" tritt während der Entwicklung auch bei vielen ZNS-Neuronen auf, die nicht auf NGF ansprechen (Cunningham *et al.* 1982; Finlay & Slattery 1983; Finlay *et al.* 1982; Hamburger 1975; Jeffery 1984; Potts *et al.* 1982; siehe als *Review*: Cowan *et al.* 1984; Cunningham 1982). Zudem sind verschiedene degenerative Erkrankungen des ZNS mit unbekannter Ursache immer noch nicht aufgeklärt (DaPrada *et al.* 1984; Javoy-Agid *et al.* 1984; Marchbanks 1982; Penney & Young 1983; Terry & Davies 1980). Daher suchte man nach neurotrophischen Faktoren für andere Neuronen des ZNS.

3. BDNF (=brain-derived neurotrophic factor), ein neuer neurotrophischer Faktor aus dem Schweinehirn

Barde *et al.* (1978,1980) stellten fest, daß Ratten-C6-Astrozytom-Zellen neben NGF (Murphy *et al.* 1977) auch andere neurotrophische Substanzen für sensorische Neuronen (Hühner-Spinalganglien-Neuronen ab E 10) produzieren, die nicht mit NGF identisch sind. Eine ähnliche Aktivität war auch in Extrakten von Ratten- und Schweinehirn vorhanden (Barde *et al.* 1980, 1982). Sie nahmen daher adultes Schweinehirn als Ausgangsmaterial (Barde *et al.* 1982) und isolierten daraus ein sehr basisches (IEP 10.3) neurotrophisches Protein mit einem Molekulargewicht von 12.3 kD, den BDNF (= brain-derived neurotrophic factor). Das Protein ist nur in sehr geringen Mengen im Ausgangsmaterial vorhanden, was einen Reinigungsfaktor von $1,4 \times 10^4$ bedingt (Barde *et al.* 1982). Die biologische Aktivität des Proteins bleibt - wie bei CNTF - nach Behandlung mit 0.1% SDS und 5% Mercaptoäthanol teilweise (zu 10%) erhalten (CNTF : 30%); nach Elution aus einem SDS-Gel ist BDNF (wie CNTF) noch biologisch aktiv (Barde *et al.* 1982; Barbin *et al.* 1984).

BDNF wirkt ähnlich wie NGF schon in sehr geringen Konzentrationen (halbmaximale Aktivität bei 0.4 ng/ml) *in vitro* auf embryonale periphere sensorische Neuronen in den Spinalganglien (die teilweise auch auf NGF reagieren <Barde *et al.* 1980>) und im *Ganglion nodosum* (auf die NGF keinen Effekt hat) (Barde & Lindsay, unveröffentlichte Ergebnisse). BDNF bewirkt außerdem *in vitro* das Überleben von Ganglienzellen der *Retina*, auf die NGF ebenfalls ohne Wirkung ist (Johnson & Barde,

unveröffentlichte Ergebnisse). BDNF hat keinen Effekt auf sympathische (von NGF-abhängige) und parasympathische (von NGF-unabhängige) Neuronen *in vitro* (siehe auch Tabelle 1).

Soweit bisher untersucht, wirkt BDNF also auf Neuronen, die entweder im ZNS liegen oder in das ZNS projizieren.

Über die Wirkungsmechanismen von BDNF ist bisher nichts bekannt. Der Nachweis, welche Gewebe bzw. welche Zelltypen im Zentralnervensystem den Faktor produzieren, könnte dazu einen Hinweis geben. Das wäre wichtig, um zu wissen, ob BDNF - ähnlich wie NGF - vom innervierten Zielgebiet her retrograd auf das Neuron einwirkt (siehe Teil V), oder ob er z.B. von Gliazellen produziert wird, die Zellkörper und Axon umgeben. Mit zwei verschiedenen experimentellen Ansätzen sollte daher hier versucht werden, Aufschluß über die Produktionsorte von BDNF im Zentralnervensystem zu gewinnen :

Zum Einen sollte die neurotrophische Aktivität von Gewebeextrakten aus verschiedenen ZNS-Regionen verglichen werden (Teil II), zum Anderen sollten Zellen mit BDNF-artiger Immunreaktivität im ZNS von Maus und Ratte mit Hilfe von indirekter Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Teil III).

II. NEUROTROPHISCHE AKTIVITÄT IM ADULTEN RATTEN-ZENTRALNERVENSYSTEM

1. Fragestellung

BDNF wird aus adultem Schweinehirn gewonnen. Die spezifische (auf den Proteingehalt bezogene) neurotrophische Aktivität von Gehirnextrakt, dem Ausgangsmaterial für die Reinigung, ist relativ niedrig. Es könnte aber durchaus möglich sein, daß BDNF in bestimmten Hirnregionen in höherer Konzentration vorkommt als in anderen, wenn dieser Faktor nur auf Subpopulationen von ZNS-Neuronen wirkt und deshalb auch regional in unterschiedlichen Mengen gebildet wird (z.B. analog zu NGF in der Iris <Barth *et al.* 1984; Ebendal *et al.* 1983>). In diesem Fall wäre BDNF möglicherweise aus einem spezifisch aktiveren Ausgangsmaterial leichter zu reinigen.

Zur Klärung dieser Frage sollte die neurotrophische (Überlebens-) Aktivität von Rohextrakten verschiedener Hirnregionen in einem Test an dissoziierten Neuronen aus Spinalganglien von Hühner-Embryonen (s.u.) *in vitro* verglichen werden. Dieser Test wurde auch für die Bestimmung der biologischen Aktivität bei der Reinigung von BDNF benutzt (Barde *et al.* 1982) (3.1.).

Das Zentralnervensystem besteht aus unterschiedlichen Zelltypen : - Neuronen, Gliazellen und anderen nicht-neuronalen Zellen (Ependymzellen, Blutgefäßzellen etc.). Welche Zellen produzieren nun Substanzen, die das Überleben sensorischer Neuronen bewirken : Neuronen oder Glia ? Dazu wurden optische Nerven, die keine Nervenzellkörper, sondern nur die Axone von Ganglienzellen der *Retina* und Gliazellen enthalten, denerviert, so daß in ihnen nur noch die Gliazellen vorhanden waren (Dahl *et al.* 1981; Fulcrand & Privat 1977; Privat *et al.* 1981; Skoff 1975; Vaughn *et al.* 1970; siehe als *Review* : Koeppen 1985). Ihre neurotrophische Aktivität sollte mit der von normalen Kontrollnerven verglichen werden (3.2.).

Die Gewebeextrakte setzten sich aus vielen verschiedenen Proteinen zusammen. Daher sollte herausgefunden werden, in welchen Molekulargewichtsbereichen eines Extrakts aus optischen Nerven bzw. Hinterwurzeln des Rückenmarks biologisch aktive Proteine vorhanden waren, und wieviel davon dem Molekulargewicht von BDNF entsprach (3.3).

2. Material und Methoden

2.1. Herstellung von Gewebeextrakten

Hirn-Gewebe von adulten WISTAR-Ratten (weibl., 200 g) wurde auf Eis präpariert, mit kalter CHF-PBS (= Ca^{++} , Mg^{++} - free phosphate buffered saline : 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 8.1 mM Na_2HPO_4 ; mit den Protease-Inhibitoren Aprotinin <20 Kallikrein U/ml>, Leupeptin <0.1 mM>; pH 7.4) gespült, und in CHF-PBS homogenisiert (jeweils 50 - 500 mg Feuchtgewicht / ml). Nach zwei Stunden Ultrazentrifugation bei 100 000 g wurde der Überstand, dem zuvor ein Aliquot für die Proteinbestimmung (nach Lowry *et al.*, 1951) entnommen worden war, mit 10% hitze-inaktiviertem Pferdeserum (Gibco) versetzt, portioniert und eingefroren (-70 °C). Es machte keinen Unterschied in der neurotrophischen Aktivität, ob das Pferdeserum vor dem Einfrieren oder erst nach dem Auftauen zugegeben wurde. Vor Gebrauch im biologischen Test (2.3.) wurden die Proben aufgetaut und durch ein 0.2 μm Gelman-Filter steril filtriert.

Für die spätere Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht wurde eine saure Fällung von Gewebeextrakten vorgenommen, was dem ersten Anreicherungs-schritt bei der Reinigung von BDNF entsprach (Barde et al. 1982). 1 g Gewebe (optische Nerven bzw. Hinterwurzeln des Rückenmarks, die in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -70 °C gelagert worden waren), wurde in 4 ml 0.2 M Phosphatpuffer (pH 6.0, 1mM EDTA, 1 mM PMSF = Phenylmethansulfonylfluorid) homogenisiert, mit HCl auf pH 4.0 gebracht, 2 Stunden auf Eis gerührt, und dann 40 min bei 20 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1N NaOH wieder auf pH 6.0 gebracht und bei 4 °C zwei Tage lang gegen 2 l H_2O (2-maliger Wechsel) dialysiert (molekulare Ausschußgrenze 3500 kD), portioniert, gefriergetrocknet und bei -70 °C gelagert. Das lyophilisierte Protein war dann relativ gut löslich.

Einen Überblick über die Eigenschaften der verschiedenen Extrakte gibt Tabelle 2.

2.2. Auftrennung nach dem Molekulargewicht :

Der lyophilisierte Extrakt nach saurer Fällung wurde in einem modifizierten *sample buffer* nach Laemmli (1970) (0.1 % SDS, 15% Glycerin, 5% Mercaptoäthanol, 0.01% Bromphenolblau, 62.5 mM Tris + HCl $\rightarrow$ pH 6.8) zu einer Konzentration von 6.5 μ g Protein/ml gelöst. Die Proben wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert und dann auf ein 10 - 25 %iges Acrylamid-Gradientengel (Obergel 3% Acrylamid) aufgetragen. 450 μ g Protein wurden für den späteren biologischen Test benutzt, etwa 60 μ g Protein liefen als Referenzprobe mit. Nach der Elektrophorese (Laemmli 1970) (Entfernung der Front von Gel-Ende etwa 9 mm) wurde der Gelstreifen herausgeschnitten und in Fraktionen von 3 - 10 mm Länge unterteilt (siehe Fig. 4 und 6).

Die Gelstücke wurden in CMF-PBS gewaschen und in Röhrchen mit je 500 μ l CMF-PBS/1% Pferdeserum (steril filtriert) überführt. Nach mindestens einer Stunde bei 4°C wurde zu jedem Röhrchen noch je 300 μ l CMF-PBS/1% Pferdeserum gegeben. Die Proben wurden dann zwei Tage lang gegen CMF-PBS dialysiert (molekulare Ausschußgrenze 3500 kD). Schließlich wurden die Gelstücke in eine 1-ml Spritze gegeben und durch einen 0.2 μ m-Filter (Gelman) gequetscht. Das zugehörige Dialysat wurde zusammen mit dem jeweiligen Gelstück steril filtriert. Die Proben wurden bei 4°C aufbewahrt und möglichst schnell (nach 3 Tagen) im Biotest (2.3.) geprüft. Vor dem Test wurde noch jeweils 10% Pferdeserum zugegeben.

2.3. Testsystem für neurotrophische Aktivität (Biotest)

An Zellkulturen von dissoziierten Neuronen aus Spinalganglien von 10 - 12 Tage alten Hühner-Embryonen wurde die neurotrophische Aktivität von Gewebeextrakten getestet. Diese Kulturen werden auch routinemäßig für die Bestimmung der biologischen Aktivität bei der Reinigung von BDNF verwendet (Barde et al. 1980, 1982).

Eier von *White leghorn* - Legehennen wurden bei 37.5°C in einen 70%-wassergesättigten Brutschrank eingelegt und 4x am Tag gewendet. Unter diesen Bedingungen schlüpfen die Küken zwischen dem 20. und 21. Tag. Von 10 - 12 Tage alten Embryonen (meist E 11) wurden die Spinalganglien in der Lumbal- und Sacral-Region entnommen (etwa 20 - 25 Ganglien pro Embryo), und in 2 ml F14-Medium gesammelt (pro Versuch etwa 3 - 5 Embryonen, 70 bis 100 Ganglien). Danach wurden die Ganglien für 20

Minuten bei 37°C in 2-ml CMF-PBS mit 0.1% Trypsin inkubiert, 2x mit 2 ml F14-Medium, das 10% (v/v) hitzeinaktiviertes Pferdeserum enthielt (=F14HS), gewaschen, und durch Trituration mit einer silikonisierten Pasteurpipette (10 - 15maliges Aufziehen) dissoziiert. Um Zellklumpen zu entfernen, wurde die Zellsuspension durch ein 40 µm Nylonnetz filtriert und mit 3 ml F14HS nachgewaschen. Die Zellen wurden dann für 3.5 Stunden auf einer Nunc-Petrischale (Durchmesser 10 cm) vorplattiert. Dabei hefteten sich die nicht-neuronalen Zellen bevorzugt an die Plastikoberfläche an. Die nicht oder nur leicht haftenden Nervenzellen wurden abgenommen und die Zahl der lebenden Zellen wurde in einem Hämatocytometer bestimmt (Trypanblau-Ausschluß-Test). Pro Embryo wurden etwa 80 000 - 100 000 Zellen gewonnen (etwa 3000 bis 6000 Zellen pro Ganglion).

24 well- costar-Platten wurden zuvor mit Poly-D,L-Ornithin (Sigma) beschichtet (0.5 mg/ml in 0.15 M Boratpuffer, pH 8.3; Einwirkungsdauer 3 - 18 Stunden), 2x mit sterilem H₂O,..... gewaschen und getrocknet. In die wells (Vertiefungen mit 16 mm Durchmesser) wurden jeweils 450 µl F14HS (=negative Kontrolle), oder F14HS mit 5 ng/ml Maus-NGF (aus Speicheldrüsen von männlichen Mäusen; Gabe von Dr. Hermann Rohrer) (=positive Kontrolle), oder F14HS mit Serienverdünnungen von Gewebeextrakten pipettiert.

In jede Vertiefung wurden dann etwa 6000 neuronale Zellen gegeben (etwa 50 - 80 µl Zellsuspension). Die Kulturschalen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 3.5% CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre inkubiert. Nach 48 Stunden wurden in jeder Vertiefung die überlebenden Neuronen (d.h. phasenhelle Zellen mit typischen Nervenfortsätzen) unter einem Phasen-Kontrast-Mikroskop mit einem 10x-Objektiv in 10 Gesichtsfeldern ausgezählt. Diese Zahl, mit 7.1 multipliziert, ergab die Anzahl überlebender Neuronen, pro Vertiefung. Der Prozentsatz überlebender Zellen wurde in einer Dosis-Wirkungs-Kurve (s.u.) gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen (siehe Fig. 1, 2, 3, 5, 7). Unter den gewählten Bedingungen überlebten ohne Zugabe eines Extrakts nur wenige Neuronen (negative Kontrolle) (abhängig von der Kontamination mit nicht-neuronalen Zellen).

3. Ergebnisse

3.1. Regionale Verteilung

Im Biotest wurden jeweils die Effekte gleicher Proteinkonzentrationen von Extrakten verschiedener Regionen des Nervensystems auf das Überleben sensorischer Hühner-Spinalganglien-Neuronen verglichen. Da die Prozentzahlen überlebender Zellen von Biotest zu Biotest schwankten, sind die Experimente untereinander nur bedingt quantitativ vergleichbar.

In Tabelle 2 habe ich eine Übersicht über die verschiedenen Gewebeextrakte und ihre Wirkung im Biotest gegeben. Dargestellt sind die Proteinkonzentration des Extrakts, bei der halbsoviele Neuronen überlebten als maximal möglich ("halbmaximale Aktivität") und - davon abgeleitet - die Anzahl trophischer Einheiten pro mg Protein. Die "halbmaximale Aktivität" definiert eine trophische Einheit; sie kann aus der jeweiligen Dosis-Wirkungskurve eines Experiments direkt abgelesen werden und bietet einen Anhaltspunkt für den Gehalt an neurotrophischen Substanzen. Je höher die Proteinkonzentration, bei der die halbmaximale Aktivität feststellbar ist, desto geringer ist der Anteil neurotrophischer Proteine, d.h. die Anzahl trophischer Einheiten pro mg Protein. Fig. 1 und Fig. 2 zeigen repräsentative Versuche.

Aus Fig. 1 und Tabelle 2 ergab sich, daß Extrakte aus Ratten-Gesamthirn eine relativ geringe spezifische (auf Protein bezogene) neurotrophische Aktivität für sensorische Neuronen enthielten. Im Vergleich dazu waren in Extrakten aus *Retina* bzw. Rückenmark 3 bzw. 6 mal mehr neurotrophische

Substanzen vorhanden (bezogen auf die "halbmaximale Aktivität"). Das ist kein bedeutender Unterschied, wenn man dabei die Schwankungen in den experimentellen Ergebnissen bedenkt (siehe Tabelle 2). Deutlich (um 1 bis 2 Zehnerpotenzen) höher war jedoch immer die biologische Aktivität von Extrakten aus optischen Nerven (140 mal in Fig. 1) und aus Hinterwurzeln des Rückenmarks (siehe Fig. 2).

Nach saurer Fällung waren in Extrakten von optischen Nerven nur noch etwa 25 - 30%, und in Extrakten von Hinterwurzeln des Rückenmarks nur noch etwa 10% der Proteine im Vergleich zu den Extrakten nach Ultrazentrifugation vorhanden. Die neurotrophische Aktivität im optischen Nerven hatte sich nicht geändert (d.h. Verlust von 70% der neurotrophischen Aktivität), in den Hinterwurzeln aber deutlich gesteigert (d.h. neurotrophische Aktivität wurde angereichert). Da weist darauf hin, daß die neurotrophischen Proteine in Hinterwurzeln und optischem Nerven unterschiedlich waren.

Die hier nachgewiesene Aktivität war nicht auf NGF zurückzuführen : NGF-Antiserum (polyklonales Schaf-Antiserum gegen Maus-NGF (nach Stöckel *et al.* 1976); 1:1000 verdünnt) hatte keinen Effekt auf die biologische Aktivität (hier nicht abgebildet). Diesem Resultat entsprechen neuere Befunde von Dr. Sigrun Korsching und Georg Auburger (MPI f. Psychiatrie/Abt. Neurochemie) (Korsching *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse) : Sie konnten mit einem hochempfindlichen zwei-seitigen Enzym-Immuntest für den direkten NGF-Nachweis sowohl in Hinterwurzeln des Rückenmarks als auch in optischen Nerven keinen NGF finden (NGF-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze von 0.05 ng/g Gewebe).

Tabelle 2 : Vergleich der neurotrophischen Aktivität von Extrakten verschiedener Regionen des Nervensystems:

Gewebe :	halbmaximale neuro- trophische Aktivität ($\mu\text{g Protein/ml}$)	Neurotrophische Einheiten *) (T.U./mg Protein)
<i>A) Überstände nach Ultrazentrifugation :</i>		
Gehirn (ganz)	1) 200	5.0
	2) 80 **)	12.5 **)
	140 *)	7.1 *)
Rückenmark	24 *)	41.6 *)
Retina	1) 75	13.3
	2) 25	40.0
	3) 42 *)	23.8 *)
Hinterwurzeln des Rückenmarks	6.0 **)	200 **)
	11.25	88.9
optischer Nerv	1) 6.25	160
	3.1	322
	18	55
	3) 1.0 *)	1000 *)
<i>B) Überstände nach saurer Fällung :</i>		
Hinterwurzeln des Rückenmarks	0.5	2000
optischer Nerv	10.0	100
	16.0	62.5

In dieser Tabelle sind die neurotrophischen Wirkungen (Überleben dissoziierter sensorischer Neuronen aus Spinalganglien embryonaler Hühnchen nach 2 Tagen in Kultur) von Extrakten verschiedener Regionen des Nervensystems dargestellt. (A): Extr. in PBS nach Ultrazentrifugation (UZ), Proteinkonz. 0.6 - 6 mg Prot./ml; B): Extr. nach saurer Fällung, Proteinkonz. 0.1 - 0.5 mg Prot./ml, = 10 - 30% der Proteine in Extr. nach UZ).

*) Aus der Dosis-Wirkungs-Kurve (siehe Text und Fig. 1, 2) wurde diejenige Proteinkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) ermittelt, bei der halbsoviel Neuronen überlebten, als maximal möglich war ("halbmaximale Aktivität"). Aus der halbmaximalen Aktivität (hmA) (definiert als eine trophische Einheit) wurde die Anzahl trophischer Einheiten (trophic units = T.U.) pro mg Protein errechnet (T.U./mg = 1000 : hmA).

Die Zahlen 1), 2), 3) bedeuten jeweils verschiedene Extraktionen. Pro Zeile ist ein Biotest dargestellt.

*) siehe Fig. 1

**) siehe Fig. 2

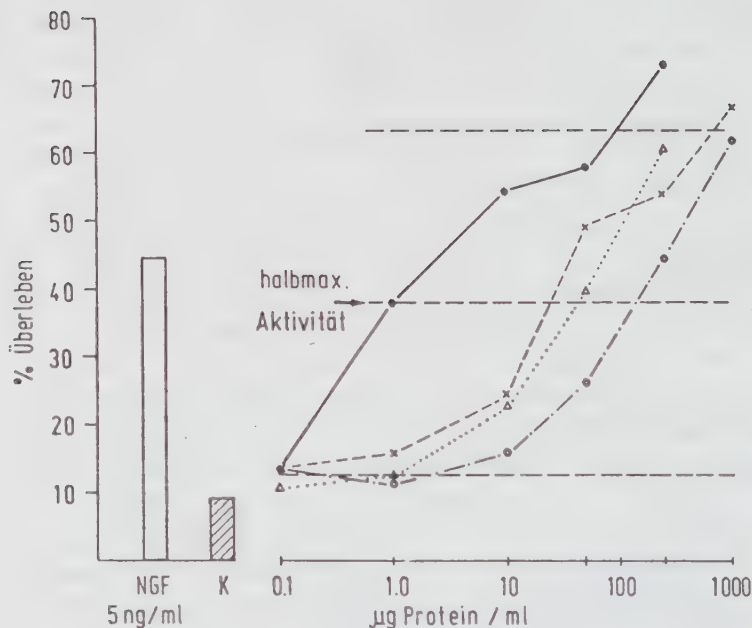


Fig. 1 : Dosis-Wirkungskurven für die neurotrophischen Effekte (Überleben von sensorischen Neuronen aus Spinalganglien von 11 Tage alten Hühner-Embryonen) von optischem Nerv (●—●), Retina (△·····△), Rückenmark (x---x), und Gesamthirn (o---o).

Abszisse : Proteinkonzentrationen der Extrakte; Ordinate : % überlebende Neuronen nach 2 Tagen in Kultur. Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils zwei Messungen. Die obere gestrichelte Linie zeigt den Sättigungswert an, d.h. den Prozentsatz maximal überlebender Neuronen (Erfahrungswert aus früheren Experimenten). Die halbmaximale Aktivität (siehe Text und Legende zu Tabelle 2) liegt in diesem Experiment für den optischen Nerven bei 1.0, für das Rückenmark bei 24, für die *Retina* bei 42, und für das Gesamthirn bei 140 µg Protein/ml (siehe auch Tabelle 2). Zum Vergleich sind der Prozentsatz überlebender Neuronen mit 5 ng/ml NGF (positive Kontrolle) und ohne Zusatz neurotrophischer Substanzen (negative Kontrolle = K) gezeigt.

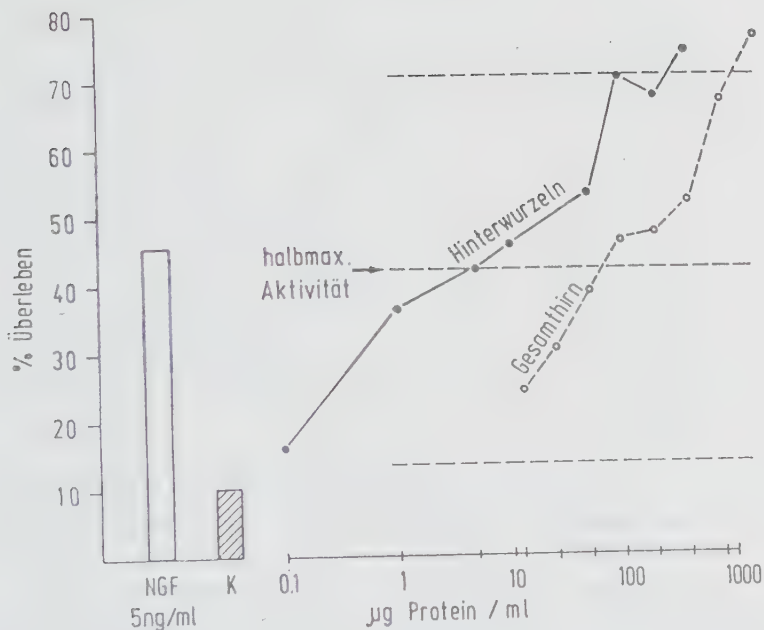


Fig. 2 : Dosis-Wirkungskurven für die neurotrophischen Effekte (Überleben sensorischer Neuronen nach 2 Tagen in Kultur) von Extrakten aus Hinterwurzeln des Rückenmarks (●—●) und aus Gesamthirn (o- -o) (siehe Legende zu Fig. 1).

Dargestellt sind die Mittelwerte aus jeweils zwei Messungen. Die halbmaximale Aktivität liegt in diesem Experiment für die Hinterwurzeln bei 5.0, und für das Gesamthirn bei 80 µg Protein/ml.

3.2. *Neurotrophische Aktivität im optischen Nerven : Von welchem Zelltyp produziert ?*

Adulten weiblichen WISTAR-Ratten (200 g) wurde in tiefer Äther-Narkose jeweils das linke Auge entnommen, was zu einer Degeneration der Axone im optischen Nerven führte. Zwei bzw. neun Wochen nach Enukleation wurden Extrakte von den denervierten linken optischen Nerven, in denen zu diesem Zeitpunkt nur noch Gliazellen am Leben waren, hergestellt und auf ihre neurotrophische Aktivität hin getestet. Als Kontrolle dienten Extrakte aus den kontralateralen intakten optischen Nerven. Verglichen wurden gleichzeitig Extrakte aus den denervierten und aus den kontralateralen optischen *Tecta*. Die Ergebnisse sind in Fig. 3 und Tabelle 3 dargestellt.

Aus diesen Experimenten ergab sich, daß in dem verwendeten Testsystem sich die neurotrophische Aktivität im optischen Nerven und im optischen *Tectum* nach Denervation nicht deutlich veränderte. Da auf der enukleierten Seite im optischen Nerven nur noch Gliazellen am Leben und die Axone der Ganglienzellen der *Retina* degeneriert waren, mußten die neurotrophischen Substanzen im optischen Nerven von Gliazellen produziert worden sein.

Tabelle 3 : Neurotrophische Aktivität im optischen Nerven nach Enukleation :

Gewebe	Halbmaximale neurotrophische Aktivität ($\mu\text{g Protein/ml}$)	Neurotrophische Einheiten *) (T.U./mg Protein)
A) 2 Wochen Enukleation :		
opt. Nerv (enukleiert)	13.5	74.1
	6.25	160.0
opt. Nerv (Kontrolle)	15.0	66.7
	13.0	76.9
<i>Tectum</i> (enukl.)	200	5.0
	300	3.3
<i>Tectum</i> (Kontr.)	175	5.7
	180	5.5
B) 9 Wochen Enukleation :		
opt.Nerv (enukl.)	3.6 *)	277.8 *)
opt.Nerv (Kontr.)	5.0 *)	200 *)
<i>Tectum</i> (enukl.)	130 *)	7.7 *)
<i>Tectum</i> (Kontr.)	90 *)	11.1 *)

In dieser Tabelle sind die halbmaximale neurotrophische Aktivität und die neurotrophischen Einheiten pro mg Protein (*): Def. siehe Legende zu Fig. 1) im denervierten und im normalen (kontralateralen) optischen Nerven zwei (A) und neun (B) Wochen nach unilateraler Enukleation dargestellt. Zum Vergleich sind die neurotrophischen Aktivitäten der zugehörigen *Tecta* angegeben, die jeweils 10 - 50 mal niedriger liegen.

Die neurotrophische Aktivität im optischen Nerven wird durch Enukleation nicht verändert.

*) siehe Fig. 3

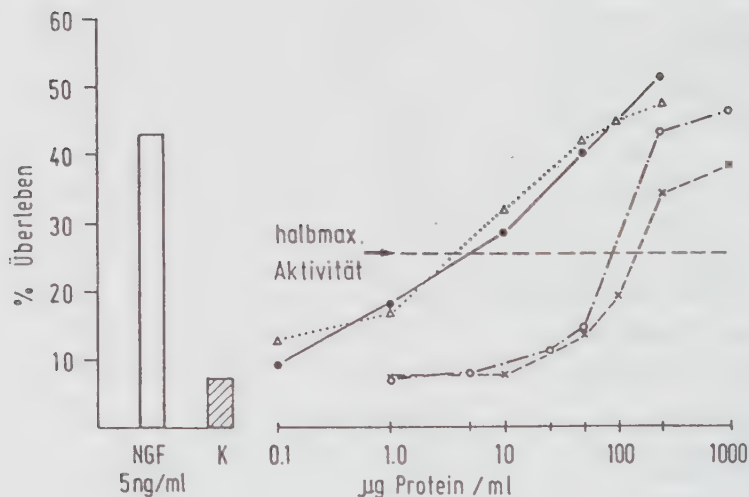


Fig. 3 : Dosis-Wirkungskurven für die neurotrophische Aktivität (Überleben sensorischer Neuronen nach 2 Tagen in Kultur) von Extrakten aus denervierten optischen Nerven (Δ·····Δ) und normalen Kontrollnerven (●—●) neun Wochen nach unilateraler Enukleation. Zum Vergleich wurde zusätzlich die neurotrophische Aktivität der zugehörigen optischen Tecta bestimmt (denerviertes Tectum : x----x; Kontroll-Tectum : o----o) (Mittelwerte aus jeweils zwei Messungen).

Man kann erkennen, daß sich die spezifische neurotrophische Aktivität von denervierten und nicht denervierten optischen Nerven nicht signifikant unterscheidet und daß die optischen Nerven wesentlich mehr neurotrophische Substanzen enthalten als die zugehörigen optischen Tecta (siehe auch Tabelle 3).

3.3. *Molekulargewichtsverteilung der neurotrophischen Aktivität :*

Um herauszufinden welche nach Molekulargewicht unterschiedlichen neurotrophischen Proteine in den Extrakten vorhanden waren, wurden Extrakte von Hinterwurzeln des Rückenmarks und von optischen Nerven (jeweils von adulten WISTAR-Ratten) nach saurer Fällung durch Elektrophorese auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (siehe Fig. 4 und 6). Die Proteine wurden aus dem Gel eluiert und dann auf ihre biologische Aktivität hin getestet (siehe Material und Methoden). (Nach saurer Fällung enthielten Extrakte von Hinterwurzeln noch 10%, Extrakte von optischen Nerven noch 30% der Proteine im Vergleich zu Extrakten nach Ultrazentrifugation <siehe Tabelle 2>). Die spezifische Aktivität von Hinterwurzel-Extrakten war nach saurer Fällung etwa 20x höher als von Extrakten des optischen Nerven <siehe Tabelle 2>.)

Aus diesen Versuchen (Fig. 4 - 7) ergab sich : Nach saurer Fällung wurde im optischen Nerven etwa 20% der neurotrophischen Aktivität (Überleben dissoziierter sensorischer Neuronen) durch ein Protein bzw. Proteine vom Molekulargewicht des BDNF (12 kD) repräsentiert (in einer Region mit erkennbar wenig Protein). Die Hauptaktivität (ca. 80%) lag jedoch bei dem Molekulargewicht von 24 - 26 kD (siehe Fig. 5). In den Hinterwurzeln des Rückenmarks trat zusätzlich noch eine Hauptaktivität im Molekulargewichtsbereich von 40 kD auf, und dort war auch relativ weniger Aktivität im Molekulargewichtsbereich von 12 kD vorhanden (Nebenaktivitätsgipfel kaum signifikant; siehe Fig. 7). Sowohl die

Aktivität im Molekulargewichtsbereich von 12 - 13 kD als auch die Aktivität im Molekulargewichtsbereich von 24 - 26 kD (der β -NGF-Monomer hat das Molekulargewicht 13 kD) ließen sich nicht durch NGF-Antiserum hemmen (polyklonales Schaf-Antiserum gegen Maus-NGF <nach Stöckel *et al.* 1976>; 1:1000 in F14HS).

Somit war gezeigt, daß die neurotrophischen Aktivitäten im optischen Nerven nach saurer Fällung zu 80% auf eine Proteinfraction vom Molekulargewicht 24 - 26 kD, und zu 20% auf eine Proteinfraction vom Molekulargewicht 12 - 13 kD zurückzuführen sind, die beide nicht NGF entsprechen.

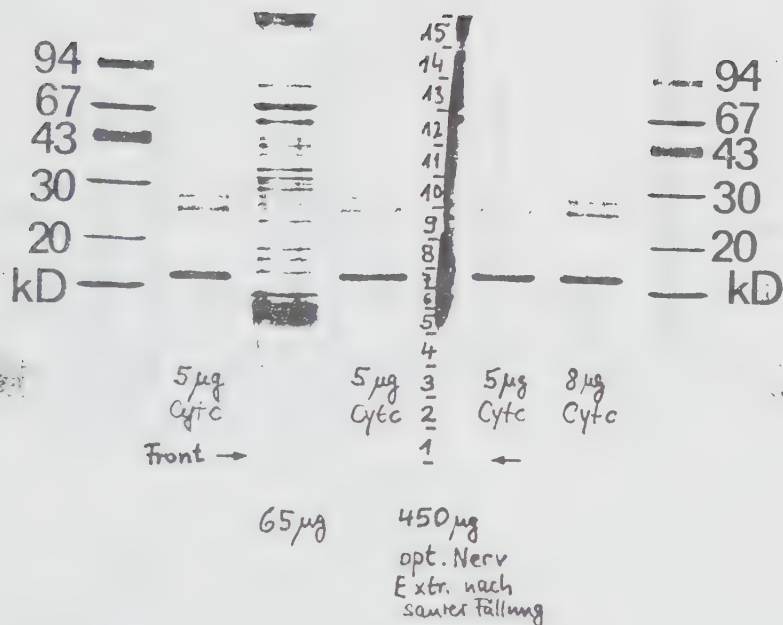


Fig. 4 : Molekulargewichtsauftrennung eines Extrakts aus optischen Nerven (nach saurer Fällung) auf einem 10-25%igen SDS - Polyacrylamid - Gradienten - Gel (Coomassie-Blue-Färbung).

In diesem Gelsystem dient Cytochrom c (12,3 kD) als Molekulargewichtsmarker für BDNF. Die Gelbahn, auf der 450 µg Extrakt aufgetragen waren, wurde herausgeschnitten, in die angegebenen Fraktionen unterteilt, die Proteine eluiert und auf ihre neurotrophische Aktivität getestet (Fig. 5).

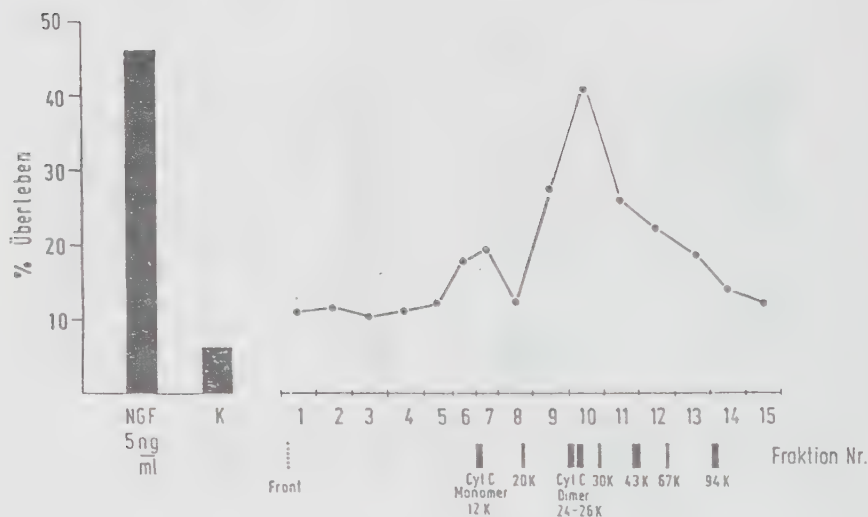


Fig. 5 : Repräsentativer Biotest mit den aufgetrennten Molekulargewichtsfractionen von optischem Nerv - Extrakt aus Fig. 4.

Abszisse : Molekulargewichtsfractionen (Punkte jeweils in der Mitte des Gelstücks); Ordinate : % Überleben der sensorischen Neuronen (jeweils eine Vertiefung pro Fraktion).

Die Proteine wurden fraktionsweise aus dem Gel eluiert (siehe Material und Methoden) und jeweils 1:1 mit P14HS-Medium verdünnt.

Man erkennt einen Hauptgipfel der Aktivität bei dem Molekulargewicht von 24 - 26 kD (entsprechend dem Cytochrom c-Dimer) und einen Nebengipfel bei dem Molekulargewicht von 12.3 kD (entsprechend dem Cytochrom c-Monomer). Dieser Nebengipfel komigriert mit BDNF.

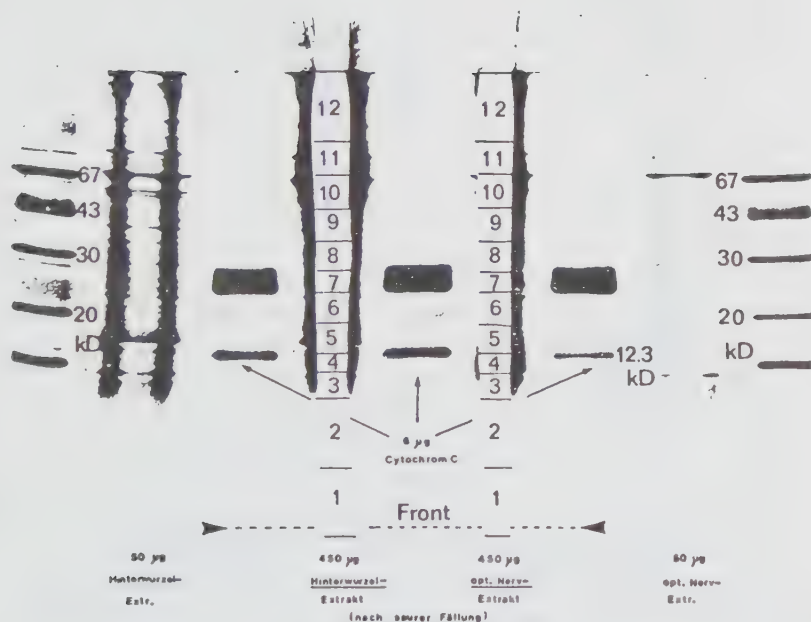


Fig. 6 : Molekulargewichtsauffrennung eines Extrakts aus Hinterwurzeln des Rückenmarks und eines Extrakts aus optischen Nerven (nach saurer Fällung) auf einem 10-25%igen SDS-Polyacrylamid-Gradienten-Gel (Coomassie-Blue-Färbung).

Beide Gelbahnen (je 450 µg Protein) wurden in dieselben Molekulargewichtsfractionen unterteilt. Weiteres siehe Legende zu Fig. 4.

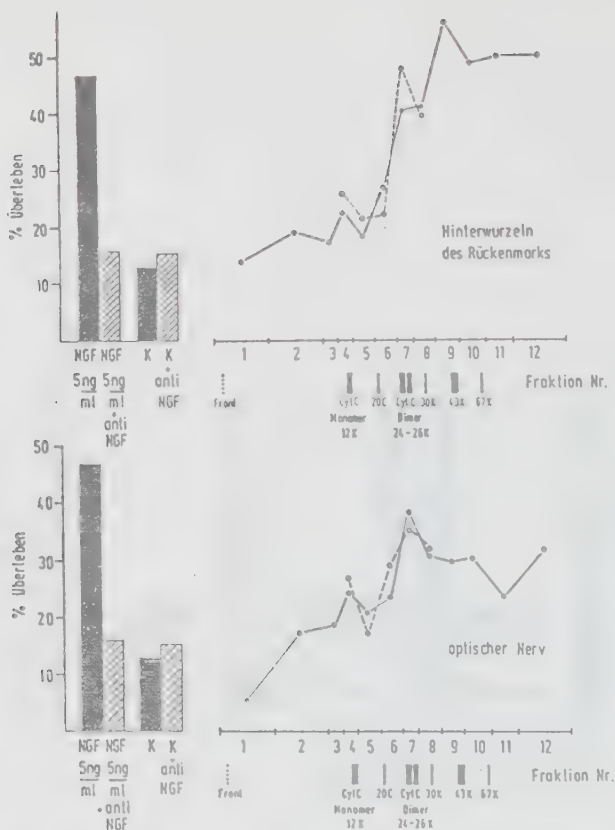


Fig. 7 : Biostest der Molekulargewichtsfractionen von optischem Nerv - Extrakt und Hinterwurzel - Extrakt aus Fig. 6.

Die Proteine wurden nach Elution aus dem Gel jeweils 1 : 1.25 mit F14HS-Medium verdünnt (siehe Legende zu Fig. 5).

———— = Extrakt in F14HS ohne NGF-Antiserum
(jeweils Mittelwert aus zwei Messungen)

----- = Extrakt in F14HS mit NGF-Antiserum
(Endkonz. 1:1000) (jeweils ein *well*)

NGF-Antiserum blockiert in der verwendeten Konzentration die neurotrophische Wirkung von NGF (5 ng/ml) völlig. Es hat aber keinen Effekt auf die neurotrophische Aktivität der Molekulargewichtsfractionen zwischen 12 und 26 kD. Man erkennt im optischen Nerven einen Hauptgipfel bei dem Molekulargewicht von 24 - 26 kD und einen Nebengipfel bei dem Molekulargewicht von 12 - 13 kD. In den Hinterwurzeln ist zusätzlich ein Hauptaktivitätsgipfel vom Molekulargewicht 40 kD vorhanden.

4. Diskussion : Regionales Vorkommen und Charakterisierung neurotrophischer Aktivität im adulten Ratten-Zentralnervensystem

In den vorliegenden Experimenten habe ich die neurotrophische Aktivität von Extrakten verschiedener Regionen des adulten Ratten-Zentralnervensystems im Bezug auf das Überleben dissoziierter Neuronen aus Spinalganglien von Hühner-Embryonen getestet. Spinalganglien-Neuronen wurden für den Biotest verwendet, weil dabei reine Populationen relativ einheitlicher Neuronen frei von nicht-neuronalen Zellen gewonnen werden können. (Es ist äußerst schwierig, aus dem Zentralnervensystem einheitliche Neuronenpopulationen zur Kultivierung zu erhalten.) Die sensorischen Spinalganglien-Neuronen projizieren in das Zentralnervensystem, und es ist möglich, viele Ganglien pro Embryo zu präparieren. Eine Teilpopulation der Spinalganglien-Neuronen ist zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt (siehe Einleitung) von NGF abhängig, aber schon 1978 wurde von Barde *et al.* festgestellt, daß von C6-Gliom-Zellen konditioniertes Medium und Extrakte aus Ratten- oder Schweinehirn ähnliche, jedoch von NGF unterscheidbare Effekte auf das Überleben von Hühner-Spinalganglien-Neuronen haben (Barde *et al.* 1978, 1980). Das führte dann schließlich zur Reinigung von BDNF aus adultem Schweinehirn (Barde *et al.* 1982).

In einem ersten Schritt habe ich die lokale Verteilung von neurotrophischer Aktivität in verschiedenen Regionen des Ratten-Zentralnervensystems anhand von Extrakten untersucht. Die spezifische (auf den Proteingehalt bezogene) neurotrophische Aktivität von Gesamthirnextrakten lag im Bereich

von 5 bis 12 trophischen Einheiten pro mg Protein (T.U./mg), war also ziemlich niedrig. Das stimmt mit den Ergebnissen von Barde *et al.* (1978, 1980, 1982) überein. Etwas höher war die neurotrophische Aktivität der *Retina* (13 - 40 T.U./mg) und des Rückenmarks (42 T.U./mg). Am höchsten jedoch war der Gehalt an neurotrophischen Substanzen im optischen Nerven (55 - 1000 T.U./mg) und in Hinterwurzeln des Rückenmarks (200 T.U./mg). Die hohe neurotrophische Aktivität im optischen Nerven erschien auch deswegen so interessant, weil der optische Nerv Axone der Ganglienzellen der *Retina* enthält, die auf BDNF ansprechen (Johnson & Barde, unveröffentlichte Ergebnisse).

Der optische Nerv enthält fast nur weiße Substanz, d.h. Axone und Gliazellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) (Peters *et al.* 1976; Wendell-Smith *et al.* 1966). Ebenso bestehen die Hinterwurzeln des Rückenmarks aus Axonen und Schwannzellen. Das Rückenmark setzt sich aus weißer und grauer Substanz, etwa im Verhältnis 2:1, zusammen. Im Gesamthirn ist der relative Anteil an weißer Substanz sehr viel niedriger. Somit schien - mit Ausnahme der *Retina* - eine Korrelation zwischen dem Anteil an weißer Substanz im Gewebe und dem Gehalt an neurotrophischen Substanzen zu existieren.

In der weißen Substanz sind besonders viele Gliazellen enthalten. Ich konnte nachweisen, daß denervierter optischer Nerv neurotrophisch so aktiv blieb wie normaler Kontrollnerv. Nach Enukleation degenerieren die Axone der Ganglionzellen der *Retina*, während die Astrozyten, die die größte Zellpopulation im optischen Nerven darstellen, hypertrophieren und die sogenannte Glia-Narbe bilden (Dahl *et al.* 1981; Fulcrand & Privat 1977;

Politis & Houle 1985; Privat *et al.* 1981; Skoff 1985; Vaughn *et al.* 1970; siehe als *Review* : Koeppen 1985). Dieses Resultat zeigte, daß die neurotrophischen Substanzen im optischen Nerven von Gliazellen, wahrscheinlich von Astrozyten, produziert werden. Schon früher konnten andere Autoren *in vitro* Hinweise finden, daß nicht-neuronale Zellen des Zentralnervensystems bzw. Astrozyten in Zellkultur neurotrophische Substanzen produzieren (Banker 1980; Eagleson *et al.* 1985; Lindsay 1979; Lindsay *et al.* 1982; Müller *et al.* 1984; Varon *et al.* 1984; Whatley *et al.* 1981).

In Gewebeextrakten sind viele verschiedene Proteine vorhanden, und es wäre denkbar, daß eine Vielzahl neurotrophischer Substanzen, einschließlich NGF, im Zentralnervensystem vorkommen. Die neurotrophischen Substanzen in den Hinterwurzeln, aber weniger im optischen Nerven, blieben nach saurer Fällung im Überstand. NGF, der bekannteste neurotrophische Faktor, war nicht an den biologischen Wirkungen der Extrakte beteiligt: - Antiserum gegen Maus-NGF konnte die neurotrophischen Aktivitäten nicht blockieren. Dr. Sigrun Korsching und Georg Auburger (MPI f. Psychiatrie/ Abt. Neurochemie) (Korsching *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse) konnten mit einem hochempfindlichen zwei-seitigen Enzym-Immuntest für NGF zeigen, daß in Hinterwurzeln des Rückenmarks und in optischen Nerven der Ratte kein NGF nachweisbar ist (NGF-Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze). Jedoch konnten sie im Rattenhirn signifikante Mengen von NGF nur im *Hippocampus* und im *Neocortex* finden, was auf eine lokale Synthese von NGF in diesen Regionen hinweist (Korsching *et al.* 1985; siehe auch Teil V).

Daher war es erstaunlich, daß nach Molekulargewichtsauftrennung der Proteine von Extrakten aus optischen Nerven nach saurer Fällung (d.h. 30% der Proteine im Vergleich zu Extrakten nach Ultrazentrifugation (UZ)) trotz der Vielzahl möglicher neurotrophischer Proteine nur zwei Fraktionen mit neurotrophischer Aktivität erkennbar waren : etwa 80% in einer Fraktion mit dem Molekulargewicht von 24 - 26 kD und etwa 20% mit dem Molekulargewicht um 12 kD (BDNF hat das Molekulargewicht 12.3 kD). BDNF verliert nach SDS-Gelelektrophorese etwa 90% seiner biologischen Aktivität, während CNTF (Molekulargewicht 20 kD) nur 2/3 seiner biologischen Aktivität verliert (Barbin *et al.* 1984; Barde *et al.* 1982). Falls es sich bei dem 12 kD-Protein also um BDNF handelt, und bei der 24-26 kD-Fraktion um ein CNTF-artiges Protein, wäre die Relation dieser Fraktionen im Extrakt nach saurer Fällung etwa 3 : 4 gewesen.

Beide Fraktionen wurden in ihrer biologischen Wirkung nicht durch NGF-Antiserum gehemmt, trotz der Ähnlichkeit im Molekulargewicht (NGF-Monomer : 13 kD). Die aktive Fraktion mit dem Molekulargewicht von 24 - 26 kD könnte einen aktiven Vorläufer von BDNF darstellen oder enthalten; genauso gut könnte es sich dabei aber auch um ein anderes Protein (z.B. CNTF) handeln. Entsprechend unterschiedlich dürfte demnach die Relation der beiden Proteine im Ausgangsmaterial sein (s.o.). Es dürften noch lange nicht alle neurotrophischen Faktoren im Zentralnervensystem erforscht sein.

Im Gegensatz zum optischen Nerven war in den Hinterwurzeln des Rückenmarks nach saurer Fällung (etwa 10% der Proteine im Vergleich zu Extrakten nach UZ, aber 20x höhere spezifische Aktivität) der Anteil der neurotrophischen Aktivität in der Fraktion von 12 kD wesentlich geringer (kaum signifikant; max. 5%), hatte also keine Bedeutung für die neurotrophische Aktivität von Extrakten nach saurer Fällung. Wenn diese Aktivität BDNF darstellt, dürfte sie durch retrograden Transport dahin gekommen, und daher wohl in den Axonen der sensorischen Neuronen zu lokalisieren sein. In Hinterwurzeln, die die für das periphere Nervensystem typischen Schwann-Zellen enthalten, findet - im Gegensatz zum optischen Nerven - wohl keine lokale Produktion von BDNF statt. - Außerdem war neben der Aktivität in der Fraktion von 24 - 26 kD noch ein zusätzlicher Hauptaktivitätsgipfel bei dem Molekulargewicht 40 kD vorhanden.

Die Produktionsorte von BDNF im Zentralnervensystem habe ich - im folgenden Abschnitt - durch indirekte Immunfluoreszenz mit monoklonalen Antikörpern gegen BDNF nachzuweisen versucht.

5. Zusammenfassung

Die neurotrophische Aktivität von Extrakten des adulten Ratten-Zentralnervensystems wurde in einem Biotest auf das Überleben von dissoziierten sensorischen Neuronen aus Spinalganglien von 10 - 12 Tage alten Hühner-Embryonen bestimmt. Dabei ergab sich, daß die neurotrophische Aktivität von optischen Nerven und Hinterwurzeln des Rückenmarks etwa 50 bis 100 mal höher war, als von Gesamthirn. Rückenmark und *Retina* lagen in ihrer neurotrophischen Aktivität dazwischen (ca. 10 mal höher als Gesamthirn). Die neurotrophischen Substanzen im optischen Nerven wurden von Gliazellen produziert, nicht von Nervenzellen. NGF trug nicht zur biologischen Aktivität von Extrakten aus optischen Nerven bzw. Hinterwurzeln bei, und konnte in ihnen auch nicht nachgewiesen werden. Nach saurer Fällung (30% der Proteine von Totalextrakten) wurden etwa 20% der neurotrophischen Aktivität im optischen Nerven durch eine Proteinfraction vom Molekulargewicht 12 kD repräsentiert, die vermutlich BDNF darstellen oder enthalten könnte; 80% durch eine Proteinfraction mit dem doppelten Molekulargewicht. In Hinterwurzeln des Rückenmarks war nach saurer Fällung (10% der Proteine von Totalextrakten, aber 20x höhere spezifische Aktivität) der Aktivitätsanteil der Fraktion vom Molekulargewicht 12 kD gering (max. 5%); außerdem war neben der Aktivität in der Fraktion von 24 - 26 kD noch eine Hauptaktivität in der Fraktion vom Molekulargewicht 40 kD vorhanden.

III. LOKALISIERUNG BDNF-IMMUNOREAKTIVER ZELLEN IM ZENTRALNERVENSYSTEM VON MAUS UND RATTE

1. Einführung und Fragestellung :

Die Biotests mit Gewebeextrakten (siehe Teil II) hatten den Hinweis auf eine regional unterschiedliche Verteilung neurotrophischer Aktivitäten im adulten Zentralnervensystem gegeben. Da diese Extrakte jedoch höchstwahrscheinlich mehr als einen neurotrophischen Faktor enthalten (siehe II.3.3.), ist es nicht möglich, daraus direkt auf die Verteilung von BDNF im Zentralnervensystem zu schließen. Die Ermittlung der Verteilung und der Produktionsorte von BDNF im Zentralnervensystem würde es ermöglichen, etwas über die Bedeutung und die Wirkungsweise von BDNF zu erfahren. Der beste und genaueste Nachweis eines so seltenen Proteins wie BDNF ist die immunologische Lokalisierung durch spezifische Antikörper.

Zusätzlicher Aufschluß über Produktionsorte von BDNF ist eines Tages auch noch durch *in-situ*-Hybridisierung von Gewebeschnitten mit einer BDNF-spezifischen cDNA-Probe möglich, die komplementär zu Abschnitten der BDNF-mRNA ist (siehe z.B. Bandtlow *et al.* 1984; McAllister *et al.* 1983). Voraussetzung dafür ist allerdings die Kenntnis der Aminosäuresequenz des Moleküls, die zur Zeit noch nicht verfügbar ist.

Mehrere Immunisierungsexperimente zeigten, daß BDNF ein schlechtes Antigen ist. Bisher gelang es nur, zwei monoklonale Antikörper gegen BDNF zu gewinnen (Barde *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Ein Antiserum gegen BDNF ist derzeit nicht verfügbar. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb versucht, BDNF in verschiedenen Teilen und Zelltypen des Zentralnervensystems von Maus und Ratte durch indirekte Immunfluoreszenz mit diesen monoklonalen Antikörpern nachzuweisen.

Meine Arbeit stand dabei unter der Fragestellung : (1) - Wie ist die Spezifität der Antikörper ? (Test mit *dot tests*, *Western blots*) (2) - Gibt es regionale Unterschiede in der Immunfärbung, die mit dem im Biotest bestimmten Gehalt an neurotrophischen Faktoren korrelieren ? (3) - Welche Nerven- oder Glia-Zelltypen werden durch die Antikörper angefärbt ? (4) - Wie verhält sich die BDNF-artige Immunreaktivität im Verlauf der postnatalen Entwicklung ?

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Antikörper

Die Immunisierung und die Tests der Hybridoma-Überstände wurden von Dr. Yves Barde, Frau Claudia Čap, Frau Heide Thorun und Frau Ricki Scholz-Marb vorgenommen. Eine Phenylsepharosefraktion, die etwa 1% BDNF enthielt (Barde *et al.*, 1982) wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 0.1% Glutaraldehyd vernetzt (Molverhältnis Glutaraldehyd : Protein = 11:1). Die Vernetzungsreaktion wurde mit Lysin gestoppt. Eine weibliche WISTAR-Ratte wurde mit 3 mg vernetzter Phenylsepharosefraktion in komplettem Freund'schen Adjuvans immunisiert. Zwei, acht, und zwanzig Wochen nach der 1. Immunisierung wurde mit 1 - 1.3 mg vernetzter Phenylsepharosefraktion nachgespritzt (*geboostet*). Die Ratte wurde fünf Tage nach dem letzten *Boost* getötet; nach der Fusion ihrer Milz-Lymphozyten mit P3-X63-Ag8.653 - Maus - Myelomazellen wurden die Hybridoma-Überstände auf Reaktion mit 50 ng reinem BDNF, der aus einem SDS-Gel eluiert worden war, in einem Immuno-dot test (nach Hawkes *et al.*, 1982) überprüft.

Auf diese Weise wurden zwei positive Klone gewonnen (10/220/13, genannt mab 1; und 13/305/10, genannt mab 2). Beide Klone produzierten jeweils ein Ratten-IgM (wie durch Immun-Diffusions-Test festgestellt). Mab 2 war zudem ein Kryoglobulin; er fiel bei tiefen Temperaturen aus. Diese Antikörper banden nicht an Protein A. Sie konnten die biologische Aktivität von BDNF nicht blockieren und nativen BDNF nicht durch Immunpräzipitation aus einer Lösung entfernen.

In *Western blots* (Immunoblots) (Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen und Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose (nach Towbin *et al.*, 1979)) erkannten die Antikörper BDNF weder als reines Protein noch als eine Proteinbande aus Totalextrakten von (u.a.) Gehirn, Rückenmark oder optischem Nerven. Verschiedene Fixierungsprozeduren der Nitrocellulose-Papiere hatten darauf keinen Einfluß. Das könnte an der Konformation des Proteins nach dem Transfer liegen.

Auf Immuno-dot tests (nach Hawkes *et al.* 1982) reagierte mab 1 nur mit BDNF (Molekulargewicht 12.3 kD, IEP 10.3) (je 50 ng), mab 2 außerdem noch mit Lysozym (Molekulargewicht 14.4 kD, IEP 10.5). Beide Antikörper zeigten keine Reaktion mit Histonen (Proteinen mit ähnlichem isoelektrischen Punkt), Cytochrom c aus Pferdeherz (Molekulargewicht 12.3 kD, IEP 10.0) und GFAP, dem sauren Glia-Filament-Protein (Gabe von Dr. Mary Osborn, Göttingen) (Molekulargewicht 49 kD, IEP 5.7 - 5.8).

Somit erkannten beide Antikörper BDNF nur in der denaturierten Konformation, wie sie in einem leicht (mit 0.4% Formaldehyd) fixierten Gewebeschnitt (s.u.) bzw. einem Immuno-dot test vorliegt, wo BDNF direkt auf Nitrocellulose aufgetropft wird. (Der aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel eluierte BDNF ist etwa zu 90% denaturiert). Kreuzreaktivitäten der Antikörper mit BDNF-Vorläufern oder BDNF-ähnlichen Sequenzen (s.o.) können zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht ausgeschlossen werden. Die folgenden Ergebnisse müssen daher noch mit anderen Antikörpern bestätigt werden, die auch die biologische Aktivität von BDNF blockieren können oder die mit BDNF im *Western blot* reagieren.

Die Hybridoma-Überstände beider Klone wurden durch Ammoniumsulfatfällung 10fach konzentriert und für die indirekte Immunfluoreszenz dann wieder 1:10 verdünnt. Außerdem gelang es Yves Barde später, die Antikörper-produzierenden Hybridomazellen in nackte Mäuse zu injizieren und die Antikörper aus der Ascitesflüssigkeit zu reinigen (mab 1 durch Ammoniumsulfatfällung und Gelfiltration <S-300-Säule>, mab 2 durch Ausfällung in der Kälte). Die geeigneten Konzentrationen der Antikörper für die indirekte Immunfluoreszenz wurden durch Verdunnungsreihen festgestellt (mab 2 : 10 µg Protein/ml).

Für die Identifizierung von Astrozyten im Gewebe wurde ein polyklonales Antiserum gegen GFAP, das saure Glia-Filament-Protein, in der Verdünnung 1:250 verwendet (Gabe von Dr. Doris Dahl, Boston, USA). Als sekundäre Antikörper dienten gegen mab 1 und mab 2 ein Antiserum gegen Ratten-IgG aus Kaninchen, gekoppelt an Fluorescein-Isothiocyanat (=FITC) (Miles-Yeda), gegen anti-GFAP ein Antiserum gegen Kaninchen-IgG aus Ziegen, gekoppelt an FITC bzw. an Tetramethyl-Rhodamin-Isothiocyanat (=TRITC) (Nordic; Tilburg, Niederlande), jeweils in der Verdünnung 1:100.

2.2. Vorbehandlung der Gewebe

Adulte Mäuse (C57BL) bzw. Ratten (WISTAR) wurden in tiefe Äthernarkose gebracht, neugeborene bis sechs Tage alte Mäuse wurden durch Unterkühlung auf Eis anästhesiert. Dem an eine Unterlage fixierten Tier wurde nach Öffnung des Brustraumes ein Perfusionsschlauch in die linke Herzkammer eingestochen und der rechte Vorhof eröffnet. Unmittelbar anschließend wurde das Tier zunächst mit einer Vorspüllösung (nach Forssmann *et al.* 1977; physiol. Kochsalzlösung mit 32 000 U/l Heparin, 25 g/l Polyvinylpyrrolidon, 5 g/l Procain-Hydrochlorid), danach für 10 Minuten mit der Fixierungslösung durchspült. Die besten Immunfluoreszenz-Ergebnisse ergaben sich bei einer Fixierung durch 0.4% Formaldehyd in 0.1M Phosphatpuffer, pH 7.4. Die Gewebe wurden herauspräpariert, nachfixiert (Gesamtfixierzeit : 30 Minuten), dann 6 - 7x mit 0.1M Phosphatpuffer (pH 7.4) /5% Saccharose (w/v) gewaschen, und dann über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Gewebe in "tissue tec" (lab-tec division, Miles) eingebettet und auf einen Metallblock in Trockeneis aufgefroren. In einem Kryostaten wurden von den Gewebelöcken 6 - 12 μ m dicke Gefrierschnitte hergestellt, auf Objektträger, die 2x mit 2% Gelatine beschichtet worden waren, aufgeklebt und mindestens eine Stunde getrocknet.

2.3. Indirekte Immunfluoreszenz

Zunächst wurden die Gefrierschnitte mindestens 30 Minuten in PBS (= phosphate buffered saline : 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , 8.1 mM Na_2HPO_4 , 1 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2 ; pH 7.4) mit 1% (w/v) BSA (= Rinder-Serum-Albumin; von Sigma) bei Raumtemperatur rehydriert. Durch das BSA wurden auch unspezifische Bindungsstellen im Gewebe abgesättigt. - Alle folgenden Inkubationen wurden ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt. - Anschließend wurden die Objektträger waagrecht in eine feuchte Kammer gelegt. Die Schnitte wurden mit einer Lösung, die den jeweiligen ersten Antikörper enthielt, überschichtet und über Nacht inkubiert. Durch Auflegen eines Deckglases (15x15mm) konnte die Menge der Antikörperlösung von 250 - 300 μ l pro Objektträger auf 10 μ l pro Deckglas verringert werden. Außerdem war es dadurch möglich, zwei verschiedene Antikörperlösungen auf einen Objektträger aufzubringen. Das Deckglas mußte dann allerdings vor dem Waschen vorsichtig abgelöst

werden, um den Verlust zu vieler Schnitte zu verhindern.

Folgende Verdünnungen (alle in PBS/1% BSA) wurden eingesetzt : - Mab 1 und mab 2 (10fach konzentrierte Hybridoma-Überstände): 1:10; - gereinigter mab 2: 10 µg Protein/ml (diese Konzentration wurde durch Verdünnungsreihen festgestellt); - GFAP-Antiserum (D.Dahl): 1:250. Für Doppelfärbungen (Nachweis von GFAP und mab 1- bzw. mab 2-Antigen am selben Schnitt) wurden GFAP-Antiserum und mab 1 bzw. mab 2 zusammengegeben. Zur Kontrolle für unspezifische Fluoreszenz wurden vergleichbare Schnitte mit 20 µg/ml Ratten-IgG, 10% (v/v) FCS (foetalem Kälberserum) in PBS/1% BSA (Kontrolle für Hybridoma-Überstände) bzw. mit 10 µg/ml Ratten-IgG (Kontrolle für den gereinigten Antikörper) in PBS/1% BSA inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger 3 mal für je 10 Minuten in PBS und anschließend zweimal für je 15 und 10 Minuten in PBS/1% BSA gewaschen. Danach wurden die Schnitte für eine Stunde unter Lichtabschluß in der feuchten Kammer mit dem jeweiligen zweiten, an Fluorescein-Isothiocyant (FITC) gekoppelten Antikörper (je 1:100 in PBS/1% BSA) inkubiert (anti-Ratten-IgG-FITC aus Kaninchen <Miles> für mab 1, mab 2, und die Kontrolle; anti-Kaninchen-IgG-FITC aus Ziegen <Nordic; Tilburg, Niederlande> für anti-GFAP bei Einzelfärbung). Für Doppelfärbungen wurden die Schnitte zunächst für eine Stunde mit anti-Kaninchen-IgG, gekoppelt an Rhodamin-Isothiocyant (TRITC), inkubiert, mit PBS 10 Minuten gewaschen, und 10 Minuten in Kaninchen-Serum (1:5) sowie 15 Minuten in PBS/1% BSA inkubiert, um die freien Bindungsstellen des Kaninchen-Antiserums abzusättigen. Danach wurden die Schnitte für eine Stunde in der feuchten Kammer unter Lichtabschluß dem an FITC gekoppelten anti-Ratten-IgG ausgesetzt. Schließlich wurden alle Objektträger 3 mal mit PBS gewaschen und mit PBS:Glyzerin (1:1) eingedeckt. Die Schnitte wurden möglichst gleich anschließend angesehen und ansonsten bei 4°C aufbewahrt.

Die Schnitte wurden unter Auflichtfluoreszenz der Wellenlängen 450 - 490 nm (LEITZ L2-Filter-Kombination) für FITC und 530 - 560 nm (LEITZ N2-Filter-Kombination) für TRITC an einem LEITZ - ORTHOPLAN - Fluoreszenzmikroskop beurteilt (Objektive 25x, 50x, oder 100x). Ausgewählte Schnittbereiche wurden auf Kodak Tri-X Pan-Film (27 DIN) fotografiert. Um die Intensität der Immunfluoreszenzen vergleichen zu können, wurden alle Aufnahmen gleichlang belichtet (30 Sekunden).

3. Ergebnisse

In den ersten fünf Experimenten färbten beide Antikörper gegen BDNF (mab 1 und mab 2) dieselben Strukturen im Rückenmark und im optischen Nerven an (s.u.). Von Anfang an ergaben die mab 1-Präparate jedoch eine zunehmend schwächere Markierung, die sich in den späteren Experimenten nicht mehr reproduzieren ließ (trotz Lagerung der Antikörper bei -70°C). Daher habe ich im Folgenden ausschließlich die Ergebnisse der Immunoreaktivität von mab 2 dargestellt (Zusammenfassung in Fig. 25). Die hier im Anschluß gezeigten Färbungen ergaben sich nur nach einer Fixierung des Gewebes mit 0.4% Formaldehyd in 1M Phosphatpuffer für 30 Minuten (siehe 2.2.). Bei einer Fixierung mit 4% Formaldehyd wurden wesentlich weniger Strukturen angefärbt.

3.1. *Optischer Nerv*

Im normalen optischen Nerven von Ratte und Maus wurden mit mab 2 im Querschnitt Zellen mit langen Fortsätzen und einem relativ kleinen Zellkörper angefärbt (Fig. 8 und 9). Die markierten Zellen erinnerten in ihrer Morphologie und Verteilung an Astrozyten, diejenigen Gliazellen, die im Zentralnervensystem mit ihren Fortsätzen die Zwischenräume zwischen den Nervenzellen ausfüllen und mit ihren Endfüßchen um Blutgefäße und an der Hirnoberfläche (Pia) eine dichte *glia limitans* bilden. Daher wurden zum Vergleich Schnitte mit einem Antiserum gegen GFAP (dem sauren Glia-Filament-Protein, einem spezifischen Bestandteil der

intermediären Filamente in Astrozyten) inkubiert. GFAP und mab 2-Antigen wurden auch am selben Schnitt durch Doppelmarkierung nachgewiesen. Es zeigte sich (Fig. 10), daß das Antiserum gegen GFAP und mab 2 dieselben Strukturen, also Astrozyten, anfärbten. Mit dem Antiserum gegen GFAP ließen sich jedoch mehr Zellfortsätze von Astrozyten nachweisen; vor allem deswegen, weil das polyklonale GFAP-Antiserum sensitiver war als der monoklonale Antikörper mab 2. Außerdem ist GFAP in den Astrozyten wahrscheinlich in höherer Konzentration vorhanden als das mab 2-Antigen. Mit dem GFAP-Antiserum wurden fibröse Astrozyten (mit feinen Zellfortsätzen und starken Filamentbündeln) (z.B. Fig. 10b, 14b, 21d), die die größte Zellpopulation im optischen Nerven darstellen, wesentlich stärker markiert als protoplasmatische Astrozyten (mit breiteren Zellfortsätzen und weniger Filamenten) (z.B. Fig. 11b, Fig. 14d, Fig. 21b).

Die Zellfortsätze der mab 2-positiven Astrozyten verteilten sich in typischer Weise gleichmäßig und relativ dicht über den Querschnitt des optischen Nerven und grenzten einzelne Faserbündel voneinander ab. Quergeschnittene Zellfortsätze (Punkte im Bild) orientierten sich entlang der Faserbündel (Fig. 8, 9, 10).

In der Kontrolle (entsprechende Konzentration an Ratten-IgG) war nur eine unspezifische Fluoreszenz an der Oberfläche sichtbar, im Inneren des Nerven war nichts zu erkennen (Fig. 8, 9, 10).

16 Wochen nach unilateraler Denervation (Herausnehmen eines Auges) von adulten Ratten war der optische Nerv in seinem Querschnitt etwa auf 1/4 geschrumpft. Fast das gesamte Gewebe war von hypertrophierten reaktiven protoplasmatischen Astrozyten (Dahl *et al.*, 1981) angefüllt (Fig. 11). Die Anzahl der Astrozyten im Gewebe hatte sich gegenüber dem Kontrollnerv vermehrt (siehe Fulcrand & Privat 1977; Politis & Houle 1985; Privat *et al.*, 1981; Skoff 1975). Die noch erkennbaren "Löcher" enthielten wahrscheinlich abgebautes Myelin und degenerierende Oligodendrozyten. Die Intensität der GFAP-Fluoreszenz war im Vergleich zum Kontrollnerv zurückgegangen. In Doppelfärbungen (Fig. 11) war fast kein Unterschied zwischen der Färbung durch mab 2 und das Antiserum gegen GFAP festzustellen.

Bereits in der neugeborenen Maus, wo der optische Nerv noch nicht myelinisiert ist (Hartman *et al.*, 1979; Skoff *et al.*, 1976), markierte der monoklonale Antikörper mab 2 GFAP-positive Zellen (siehe Fig. 12). Die Astrozyten waren aber noch nicht so regelmäßig ausgerichtet wie beim adulten Tier.

Somit färbte mab 2 sowohl normale (vor allem fibröse) Astrozyten im intakten adulten und neugeborenen optischen Nerven, aber auch die reaktiven protoplasmatischen Astrozyten im denervierten optischen Nerven an.

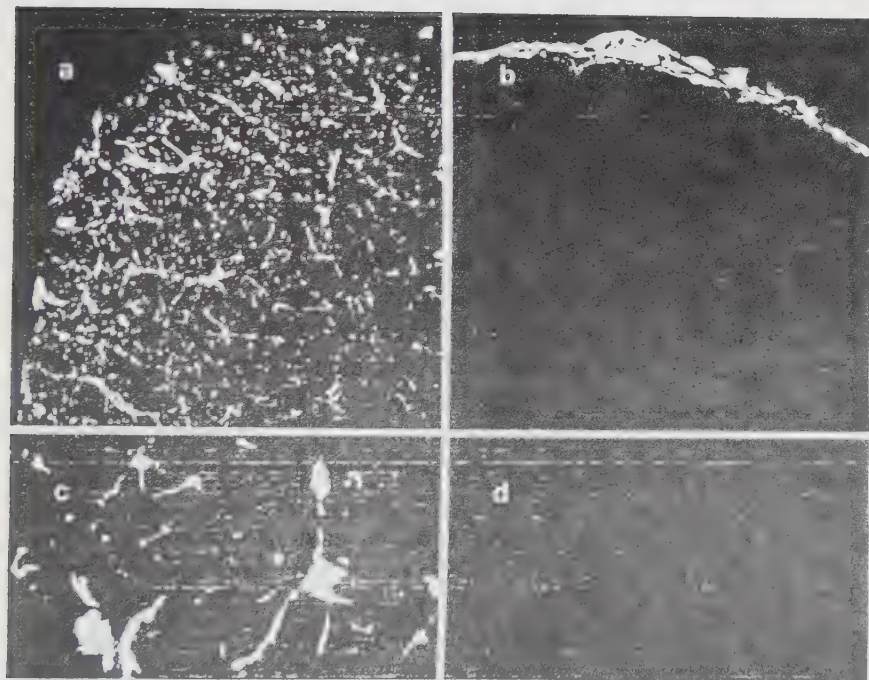


Fig. 8 : Immunfluoreszenzbild eines optischen Nerven einer adulten weiblichen Ratte (Photo-Belichtungszeit bei a) - d) : 30 sec)

a) und c) : monoklonaler Antikörper mab 2 (Hybridoma-Überstand). Man erkennt sternförmige Zellen und quergeschnittene Zellfortsätze.

b) und d) : Kontrolle (20µg/ml Ratten-IgG, 10% FCS). Unspezifische Fluoreszenz an der Oberfläche, keine Markierung in Innern.

a) und b) : 230x; c) und d) : 930x (Endvergrößerung).

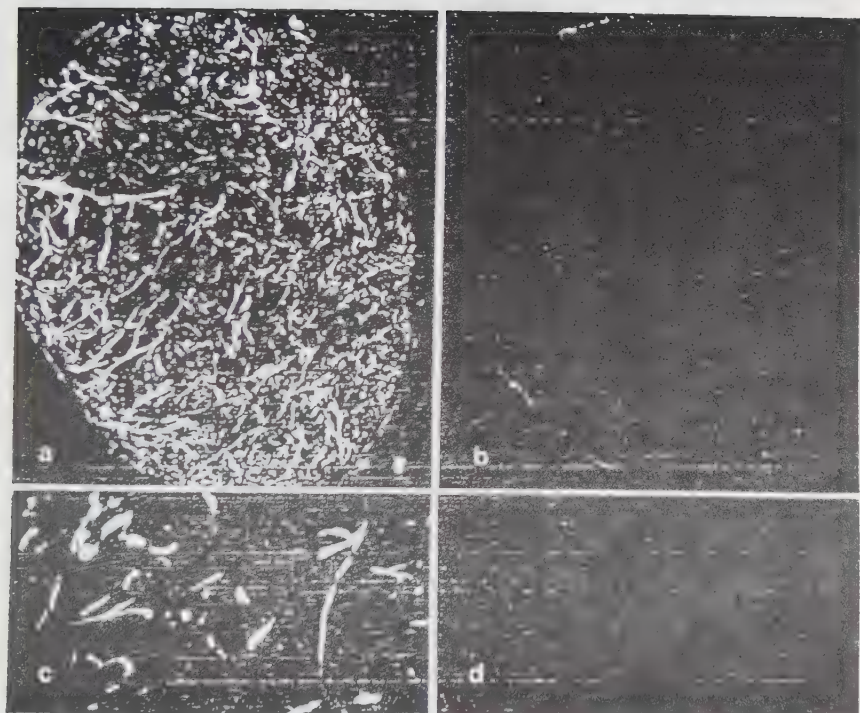


Fig. 9 : Immunfluoreszenzbild eines optischen Nerven einer adulten männlichen Maus

a) und c) : Antikörper mab 2
(10 μ g gereinigter Antikörper / ml)

b) und d) : Kontrolle (10 μ g/ml Ratten-IgG)

a) und c) : 220x; b) und d); 840x.

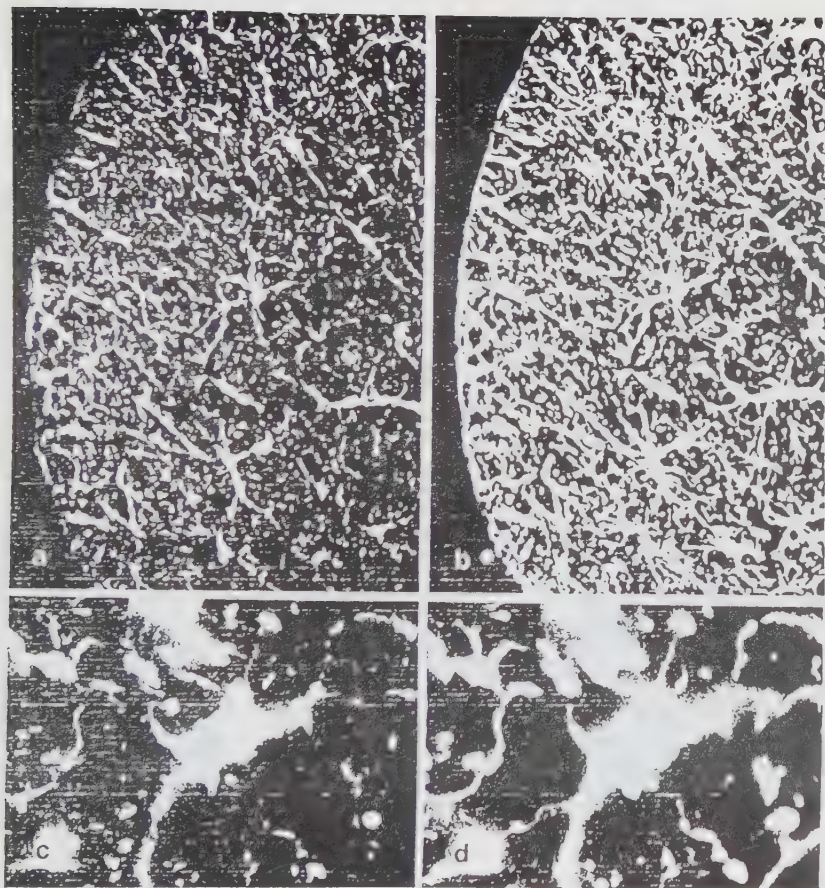


Fig. 10 : Immunfluoreszenzbild eines optischen Nerven einer adulten weiblichen Ratte

Doppelfärbung mit dem Antikörper mab 2 (Hybridoma-Überstand) und Antiserum gegen GFAP

a),c): mab 2 (FITC-Fluoreszenz)

b),d): GFAP (TRITC-Fluoreszenz)

a) und b) : 225x; c) und d) : 1350x.

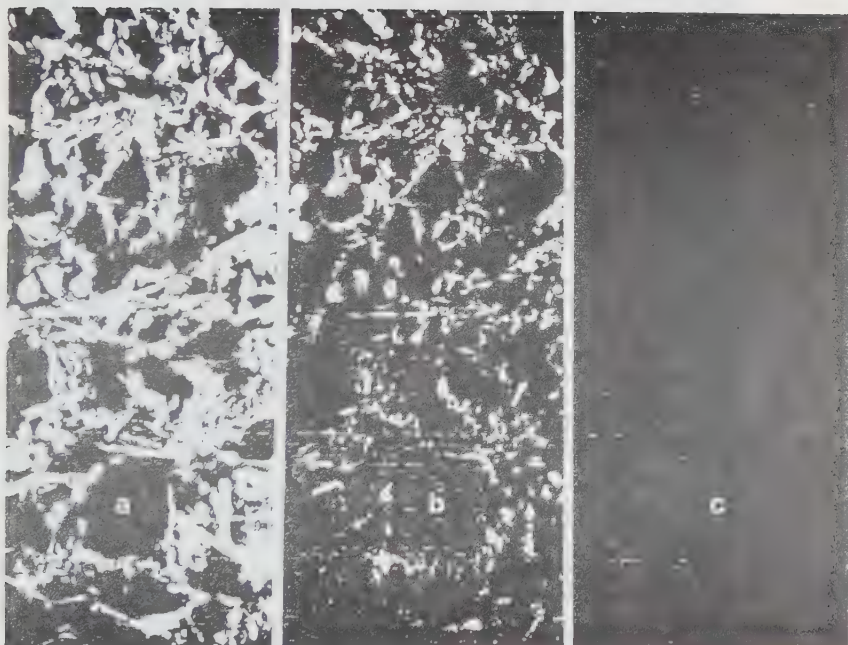


Fig. 11 : Immunfluoreszenzbild eines optischen Nerven einer adulten weiblichen Ratte 16 Wochen nach Denervation

Doppelfärbung mit dem monoklonalen Antikörper mab 2 (Hybridoma-Überstand) (a) und Antiserum gegen GFAP (b). Die Astrozyten sind stark hypertrophiert und füllen fast das gesamte Gewebe des geschrumpften optischen Nerven aus.

c) : Kontrolle (20 μ g/ml Ratten-IgG, 10% FCS)

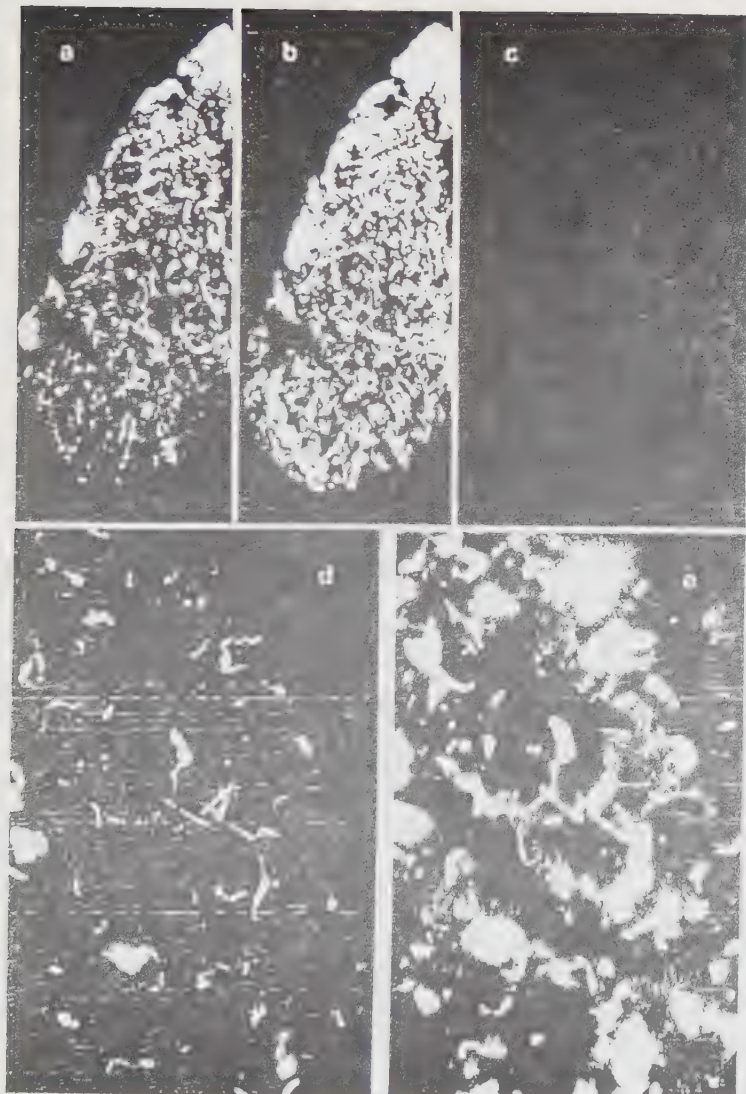


Fig. 12 : Immunfluoreszenzbild eines optischen Nerven einer neugeborenen Maus

Doppelfärbung mit dem monoklonalen Antikörper mab 2 ($10\mu\text{g}$ gereinigter Antikörper / ml) und Antiserum gegen GFAP

a), d): mab 2 (FITC-Fluoreszenz)

b), e): GFAP (TRITC-Fluoreszenz)

c) : Kontrolle ($10\mu\text{g/ml}$ Ratten-IgG)

a) - c) : 310x; d) und e) : 1250x.

3.2. *Rückenmark*

In Querschnitten der weißen Substanz des Rückenmarks waren stark mab 2-positive Zellen zu sehen, die ihre Fortsätze senkrecht zur Oberfläche ausgerichtet hatten. Zudem waren viele Zellfortsätze quer angeschnitten. Das bedeutete, daß sich diese Zellen in der weißen Substanz des Rückenmarks einerseits radial, und andererseits in Richtung der Faserzüge orientierten. Sie waren dabei ähnlich dicht angeordnet wie im optischen Nerven (Fig. 13). In der grauen Substanz (Fig. 13 und 14) waren mab 2-positive Zellen und Zellfortsätze dagegen seltener zu finden, sie waren aber häufig um Blutgefäße und den Zentralkanal angeordnet. Dort zeigten die gefärbten Zellen eine eher multipolare Morphologie. Alle mab 2-positiven Zellen ließen sich auch mit GFAP-Antiserum anfärben, waren also Astrozyten (Fig. 14). Zusätzlich waren noch GFAP-negative Ependymzellen um den Zentralkanal mit dem Antikörper mab 2 markiert (Fig. 13).

Wie im optischen Nerven, so waren auch im Rückenmark bereits bei der neugeborenen Maus GFAP-positive Astrozyten in ähnlicher Verteilung und Dichte wie beim adulten Tier durch den Antikörper mab 2 gegen BDNF anfärbbar. Als Beispiel zeige ich in Fig. 15 Astrozyten in der weißen Substanz einer 6 Tage alten Maus. Die Astrozyten waren noch weniger stark polarisiert als beim adulten Tier.

Somit markierte der monoklonale Antikörper mab 2 auch im Rückenmark von neugeborenen und adulten Mäusen Astrozyten. Die Astrozyten waren in der weißen Substanz, wo sie ähnlich dicht wie im optischen Nerven verteilt waren, sowohl radial als auch in Richtung der Faserzüge angeordnet. In der grauen Substanz waren sie seltener, hatten eine multipolare Morphologie, und traten gehäuft um Gefäße und um den Zentralkanal auf. Zusätzlich wurden durch den monoklonalen Antikörper mab 2 Ependymzellen um den Zentralkanal angefärbt.

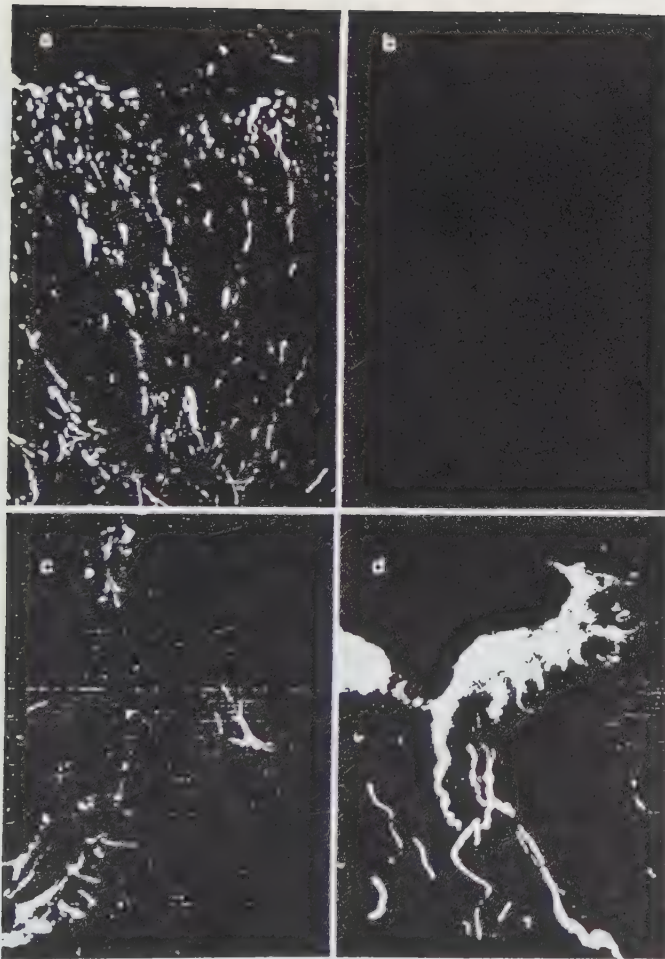


Fig. 13 : Immunfluoreszenzbild des Rückenmarks einer männlichen Maus (weiße und graue Substanz)

a), c) und d) : monoklonaler Antikörper mab 2
(10 μ g gereinigter Antikörper / ml).

a) : Man erkennt Zellen mit senkrecht zur Oberfläche orientierten Fortsätzen in der weißen Substanz und multipolare Zellen in der grauen Substanz.

c) : Astrozyten um Blutgefäß

d) : Astrozyten um Zentralkanal; zusätzliche Anfärbung von Ependymzellen

b) : Kontrolle (Ratten-IgG, 10 μ g/ml)

a) und b) : je 195x; c) und d) : je 750x.



THE RESULTS

THE RESULTS

THE RESULTS

THE RESULTS

THE RESULTS

THE RESULTS

THE RESULTS

THE RESULTS

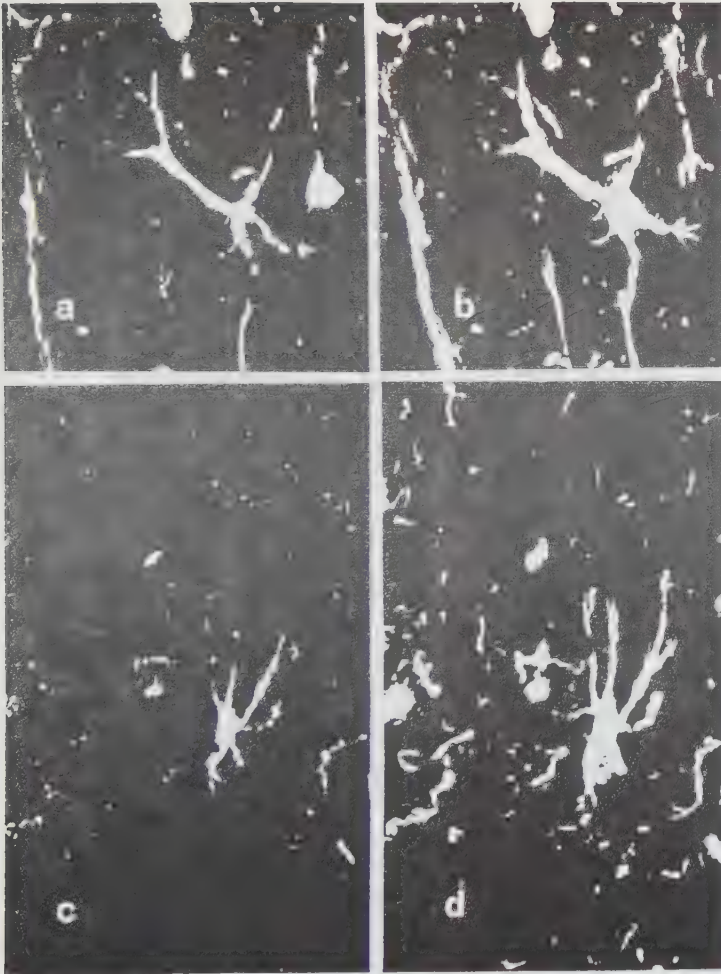


Fig. 14 : Immunfluoreszenzbild des Rückenmarks einer adulten männlichen Maus

a) und b) : weiße Substanz;
c) und d) : graue Substanz

Doppelfärbung mit dem monoklonalen Antikörper mab 2 (Hybridoma-Überstand) und Antiserum gegen GFAP

a),c): mab 2 (FITC-Fluoreszenz)
b),d): GFAP (TRITC-Fluoreszenz)

Alle Vergrößerungen 910x.

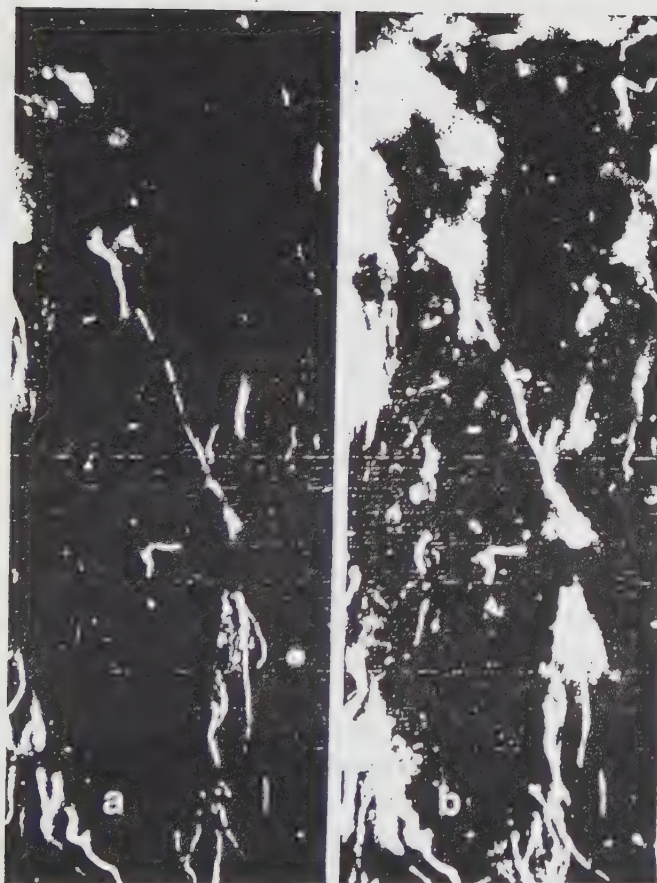


Fig. 15 : Immunfluoreszenzbild des Rückenmarks (weiße Substanz) einer 6 Tage alten Maus

Doppelfärbung mit dem monoklonalen Antikörper mab 2 ($10\mu\text{g}$ gereinigter Antikörper / ml) (a) und Antiserum gegen GFAP (b)

Alle Vergrößerungen 1640x.

3.3. *Cerebellum*

Der *Cortex* des adulten Kleinhirns baut sich aus mehreren Schichten auf : Von innen nach außen folgt auf die weiße Substanz die Körnerschicht, anschließend die Purkinjezellschicht und die Molekularschicht. Die Molekularschicht enthält die Dendritenbäume der Purkinjezellen, die Axone der Körnerzellen und die radialen Fasern der Bergmann-Gliazellen, die nur im *Cerebellum* vorkommen. Ihre Endfüßchen bilden an der Oberfläche des *Cerebellums* eine *glia limitans externa*. Die Zellkörper der Bergmann-Glia befinden sich in der Purkinjezellschicht (Cajal 1911; Palay & Chan-Palay 1974).

Mit dem Antikörper mab 2 wurden im *Cerebellum* der adulten Maus sowohl Fasern der Bergmann-Gliazellen als auch Astrozyten in der inneren Körnerschicht und in der weißen Substanz angefärbt (siehe Fig. 16 und 17). Beide Zelltypen ließen sich gleichzeitig durch GFAP-Antiserum markieren; die GFAP-Fluoreszenz der Bergmann-Glia war jedoch schwächer als die der Astrozyten. In der weißen Substanz fanden sich wesentlich mehr Astrozyten als in der inneren Körnerschicht. Dieser Unterschied war ähnlich deutlich wie der zwischen weißer und grauer Substanz des Rückenmarks.

Im *Cerebellum* der neugeborenen Maus farbte der Antikörper mab 2 Fortsätze von Gliazellen in allen Regionen, vor allem auch die typischen radialen Fasern der Bergmann-Glia. Mit dem Antiserum gegen GFAP ließen sich jedoch nur Zellen in der weißen Substanz (ventral), nicht aber in der Kleinhirnrinde nachweisen. Die Bergmann-Gliazellen waren also GFAP-negativ und mab 2-positiv (Fig. 18).

Bei der 4 Tage alten Maus waren wieder Gliazellen im gesamten Kleinhirn-Cortex durch den Antikörper mab 2 anfärbbar. Ein Teil der Bergmann-Glia produzierte jetzt auch GFAP, ein anderer Teil noch nicht (siehe Fig. 18, 19). Ebenso war es bei der 6 Tage alten Maus.

Somit erwerben die Bergmann-Gliazellen GFAP erst in Verlauf ihrer postnatalen Entwicklung, enthalten aber von Geburt an das mab 2-Antigen. Im adulten Tier sind dann alle mab 2-positiven Zellen, insbesondere die Bergmann-Gliazellen, auch GFAP-positiv.

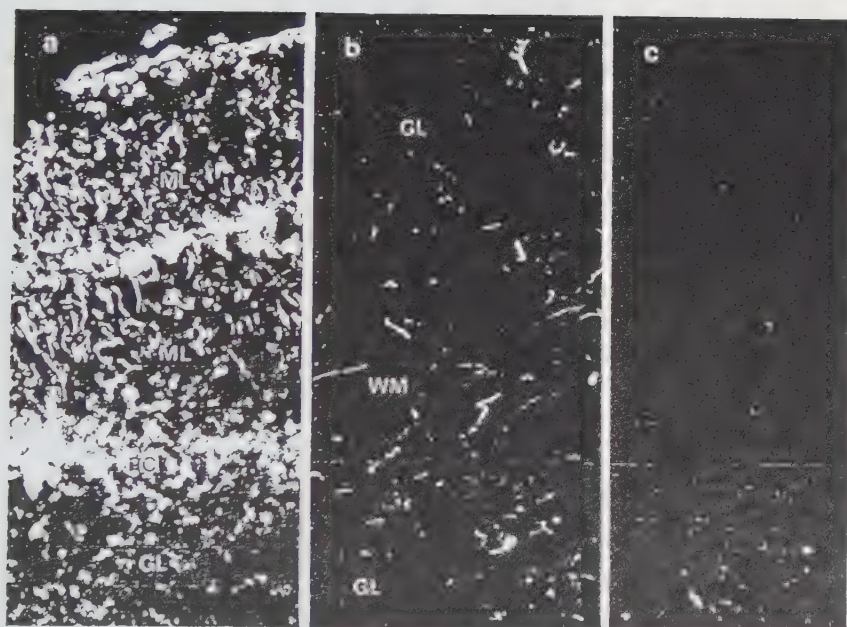


Fig. 16 : Immunfluoreszenzbild des *Cerebellums* einer adulten weiblichen Maus

a) und b) : monoklonaler Antikörper mab 2
(10 μ g gereinigter Antikörper / ml)

a) : Bergmann-Glia in Molekularschicht (ML)
b) : Astrozyten in weißer Substanz (WM) und innerer
Kornerschicht (GL). Man erkennt, daß die Astrozyten in der
weißen Substanz wesentlich dichter verteilt sind als in
der Kornerschicht.

c) : Kontrolle, 10 μ g/ml Ratten-IgG

Alle Vergrößerungen 250x.

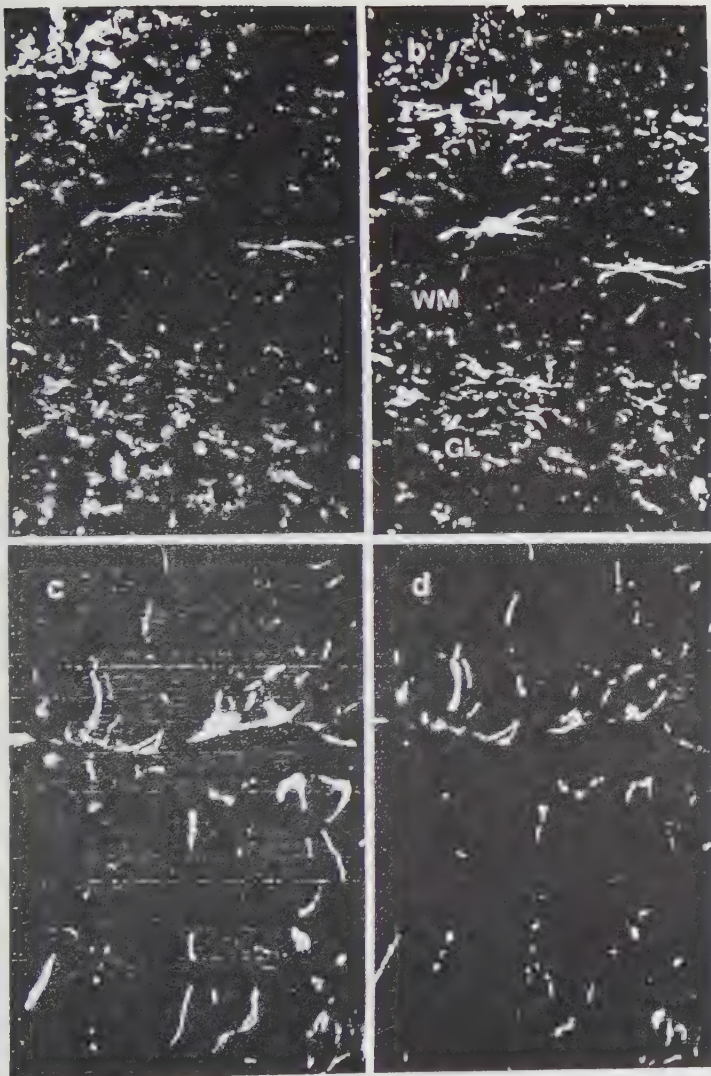


Fig. 17 : Immunfluoreszenzbild des *Cerebellums* einer adulten weiblichen Maus

Doppelfärbung mit dem monoklonalen Antikörper mab 2 (10 μ g gereinigter Antikörper / ml) und Antiserum gegen GFAP

a),c): mab 2 (FITC-Fluoreszenz)

b),d): GFAP (TRITC-Fluoreszenz)

a),b) : Astrozyten in der weißen Substanz (440x)

c),d) : Bergmann-Glia (825x) in Molekularschicht: *glia limitans* an der Hirnoberfläche



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

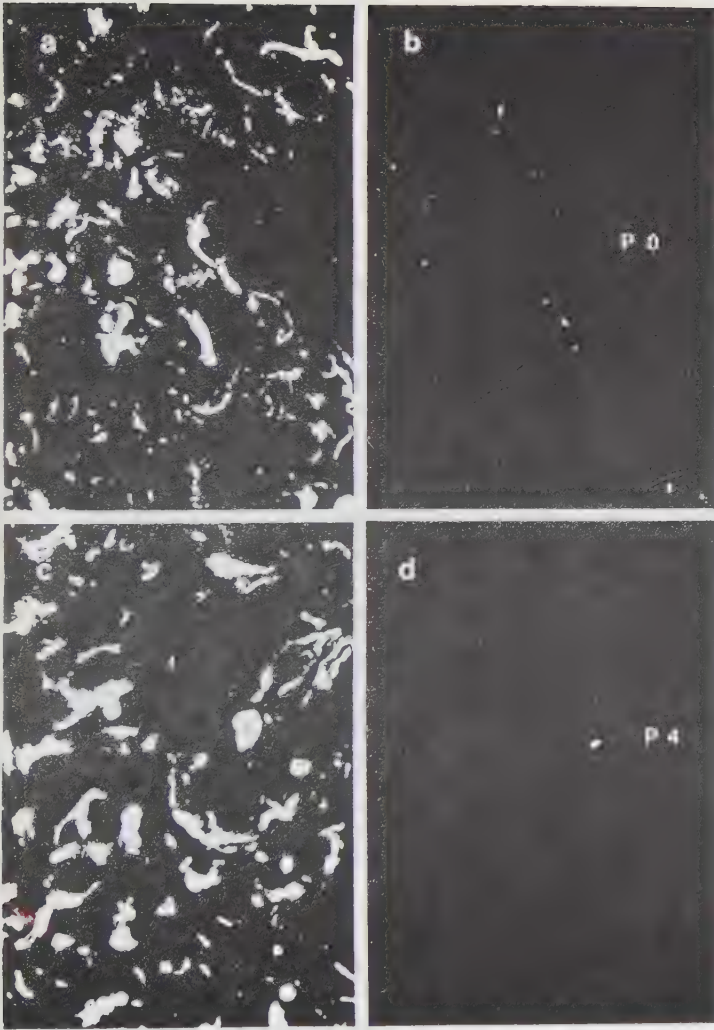


Fig. 18 : Immunfluoreszenzbild des *Cerebellums* einer neugeborenen (P0: a), b)) und einer 4 Tage alten Maus (P4: c), d))

Doppelfärbung mit dem monoklonalen Antikörper mab 2 (10 μ g gereinigter Antikörper / ml) und Antiserum gegen GFAP

a), c): mab 2 (FITC-Fluoreszenz)
b), d): GFAP (TRITC-Fluoreszenz)

Alle mab 2-positiven Zellen auf diesen Schnitten sind GFAP-negativ.

a) und b) : je 750x; c) und d) : 1310x.

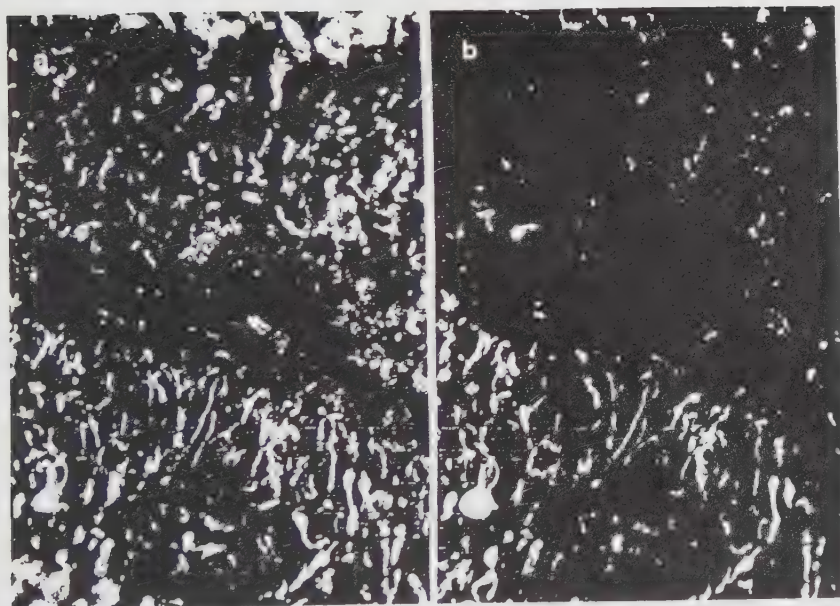


Fig. 19 : Immunfluoreszenzbild des *Cerebellums* einer
4 Tage alten Maus

Doppelfärbung mit dem monoklonalen Antikörper mab 2 (10 µg
gereinigter Antikörper / ml) und Antiserum gegen GFAP
a): mab 2 (FITC-Fluoreszenz)
b): GFAP (TRITC-Fluoreszenz)

Ein Teil der Bergmann-Glia produziert GFAP.

Alle Vergrößerungen 505x.

3.4. Andere Hirnregionen

Im optischen *Tectum* von Maus und Ratte und im *Neocortex* der Maus zeigte sich eine Verteilung mab 2-positiver Zellen, wie sie auch für die graue Substanz des Rückenmarks typisch war. Die Zellfortsätze der mab 2-positiven Astrozyten waren besonders dicht an der Hirnoberfläche (Pia) und um Gefäße, wo sie eine *glia limitans* bildeten. Dazwischen waren wenige Zellen und Zellfortsätze angefärbt (Fig. 20 und 21). Im *Neocortex* traten mab 2- und GFAP-positive fibröse Astrozyten gehäuft in der weißen Substanz und im *Corpus callosum* auf, wo sie sich wie in der weißen Substanz des Rückenmarks und des *Cerebellums* entlang der großen Faserzüge orientierten (Fig. 21).

Mab 2- und GFAP-positive Zellen waren also am häufigsten in der weißen Substanz, wo ihre Fortsätze in Richtung der Faserzüge ausgerichtet waren. In Hirnregionen mit einem hohen Anteil an grauer Substanz waren sie seltener zu finden; dort konzentrierten sie sich an der Hirnoberfläche und um Gefäße.

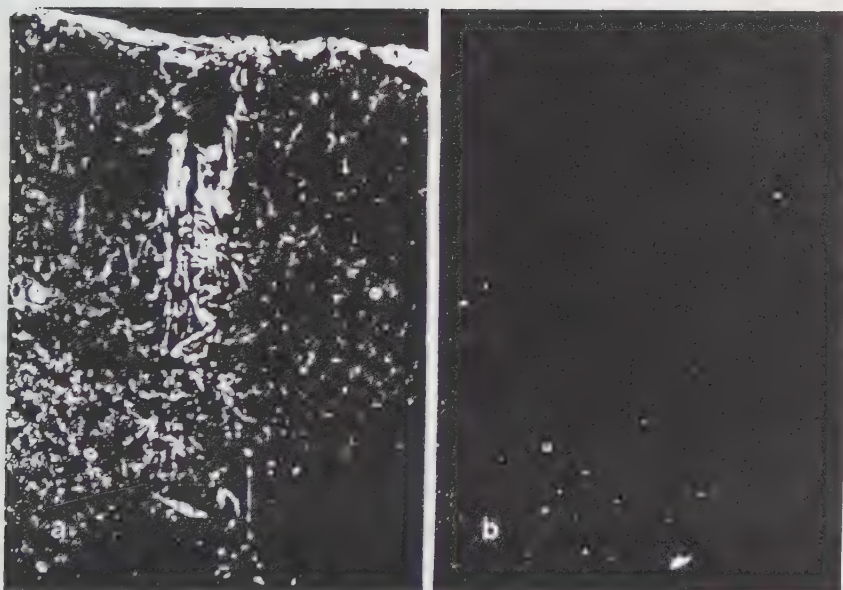


Fig. 20 : Immunfluoreszenzbild eines optischen *Testis* einer adulten weiblichen Ratte (Querschnitt)

a) monoklonaler Antikörper mab 2
(Hybridoma-Überstand)

Man erkennt gefärbte Zellfortsätze vor allem an der Oberfläche und an einem Blutgefäß entlang.

b) Kontrolle (20 $\mu\text{g/ml}$ Ratten IgG, 10% FCS)

Alle Vergrößerungen 280x.

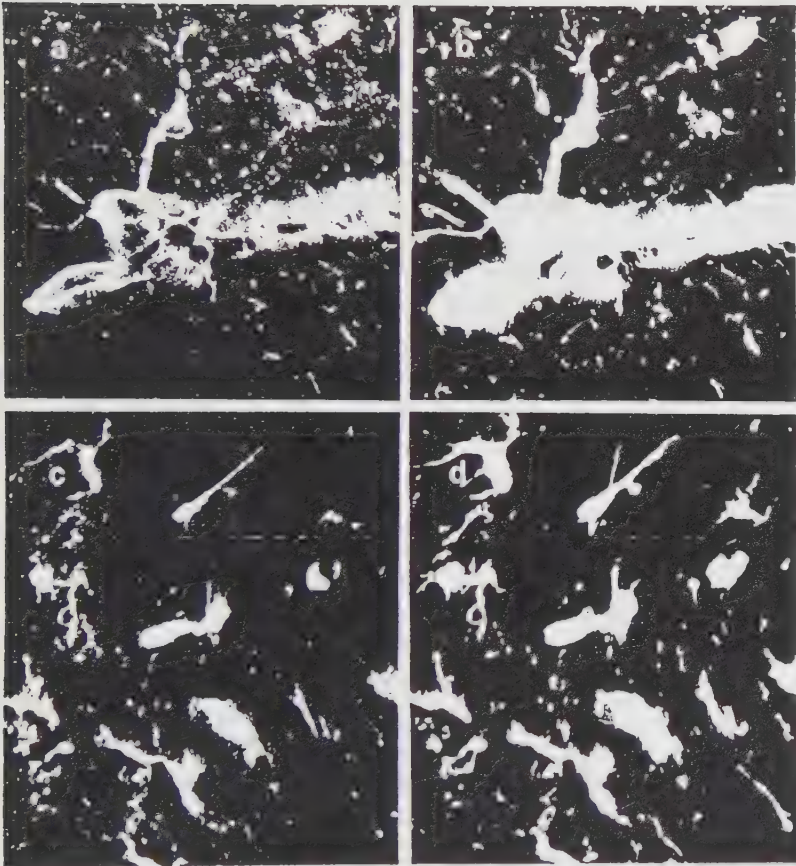


Fig. 21 : Immunfluoreszenzbild des *Neocortex* einer adulten männlichen Maus

Doppelfärbung : monoklonaler Antikörper mab 2 (Hybridoma-Überstand) und Antiserum gegen GFAP

a),c): mab 2 (FITC-Fluoreszenz)

b),d): GFAP (TRITC-Fluoreszenz)

a),b) : Astrozytenfortsätze um Blutgefäß

c),d) : Astrozytenzellkörper und -fortsätze in der weißen Substanz

Alle Vergrößerungen 830x.

3.5. *Retina*

In Querschnitten der *Retina* wurden durch den monoklonalen Antikörper mab 2 einerseits Zellen in der Ganglienzellschicht und in der Schicht des optischen Nerven angefärbt, andererseits Zellkörper in der inneren Körnerschicht mit radialen Fortsätzen, die sich oberhalb der äußeren Körnerschicht fein verzweigten (Fig. 22). GFAP-positiv waren nur die Zellen in der Ganglienzellschicht und der optischen Faserschicht. Die mab 2-positiven Zellen, die kein GFAP enthielten, entsprachen in ihrer Morphologie den Müller-Gliazellen der *Retina* (Cajal 1911). Müllerzellen sind bipolar; ihre Fasern reichen einerseits in die Ganglienzellschicht, andererseits bilden sie die *glia limitans externa* außerhalb der äußeren Körnerschicht zwischen den Zellkörpern und den Rezeptor-Fortsätzen der Rezeptorzellen (Fig. 22). Astrozyten finden sich in der *Retina* ausschließlich in der Ganglienzellschicht und der optischen Faserschicht. Sie treten gehäuft in der Nähe der Austrittsstelle des optischen Nerven auf, wo ihre Fortsätze vereinzelt bis in die äußere Körnerschicht reichen, jedoch nicht bis zu der *glia limitans externa* (hier nicht gezeigte eigene Ergebnisse).

Die Schichtung der *Retina* bildet sich während der postnatalen Entwicklung erst heraus. Bei der neugeborenen Maus markierte der monoklonale Antikörper mab 2 Zellkörper, vermutlich von Müllerzellen, in der zukünftigen inneren Körnerschicht an der Grenze zur inneren plexiformen Schicht. Diese Zellen waren in regelmäßigen Abständen voneinander aufgereiht und zeigten nur wenige Fortsätze (Fig. 23a). GFAP-positive Astrozyten waren nur um die

Austrittsstelle des optischen Nerven sichtbar und es waren auch keine GFAP-positiven Fortsätze zu erkennen.

4 Tage nach der Geburt waren mit dem monoklonalen Antikörper mab 2 feine Fortsätze der GFAP-negativen Müllerzellen angefärbt, die bereits die gesamte *Retina* durchzogen (Fig. 23c). Die Färbung der *glia limitans externa* war schwach sichtbar. Astrozyten waren jetzt auch außerhalb der Austrittsstelle des optischen Nerven zu finden, hatten aber noch kaum GFAP-positive Zellfortsätze (Fig. 23d). 6 Tage nach der Geburt hatten die Zellkörper der Müllerzellen einen größeren Abstand von der Ganglienzellschicht erreicht (durch eigene Wanderung und/oder Mitose bzw. Wachstum darunterliegender Zellen). Ihre Fortsätze waren jetzt deutlicher markiert, aber noch nicht so stark wie beim adulten Tier. Die Fortsätze der Astrozyten waren noch nicht in die innere plexiforme Schicht eingedrungen.

Eine Zusammenfassung der Entwicklung der Immunoreaktivität von mab 2 und GFAP in der *Retina* der Maus gibt Fig. 24. Der monoklonale Antikörper mab 2 färbt also in der *Retina* der Maus von Geburt an sowohl GFAP-negative Müllerzellen als auch GFAP-positive Astrozyten an.

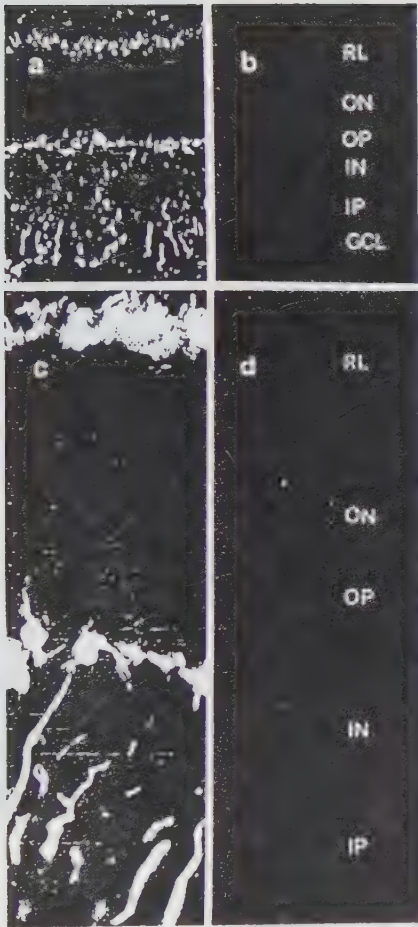


Fig. 22 : Immunfluoreszenzbild einer *Retina* einer adulten weiblichen Maus

a) und c) : monoklonaler Antikörper mab 2
(10 µg gereinigter Antikörper / ml).

Man erkennt eine Färbung der *glia limitans externa* zwischen Rezeptorschicht (RL) und äußerer Körnerschicht (ON), Zellkörper am Rand der inneren Körnerschicht, zur äußeren plexiformen Schicht (OP), und Fasern, die von der inneren Körnerschicht über die innere plexiforme Schicht (IP) bis zur Ganglienzellschicht (GCL) hinunterreichen. Bei stärkerer Vergrößerung ist zu erkennen, daß diese Zellen Fortsätze nach beiden Seiten haben.

b) und d) : Kontrolle (10 µg/ml Ratten-IgG)

a) und b) : 280x; c) und d) : 1000x.

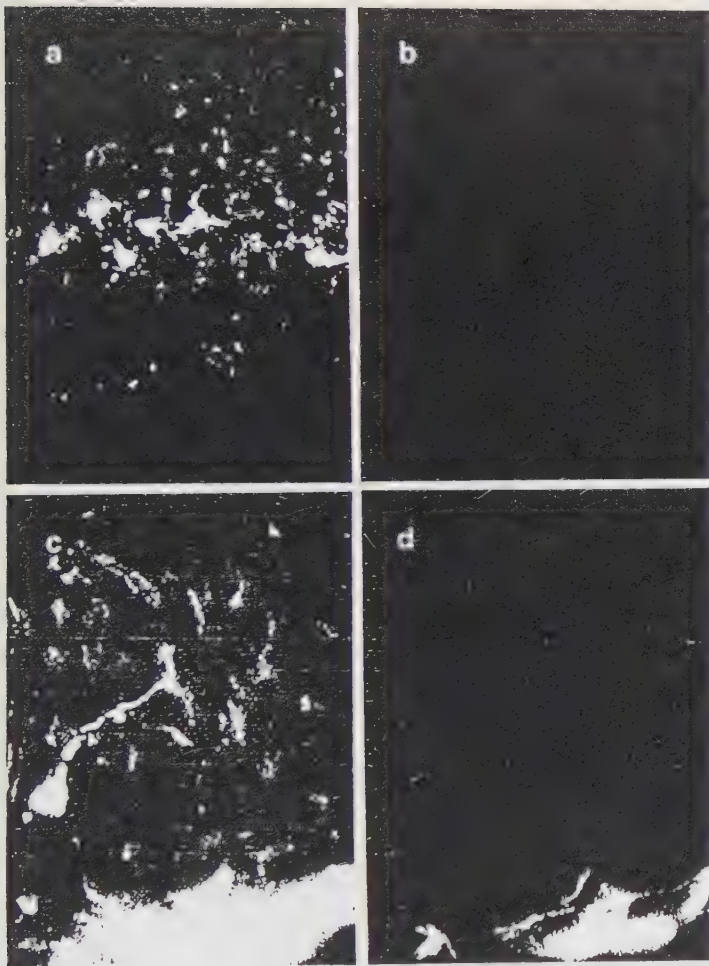


Fig. 23 : Immunfluoreszenzbild einer *Retina* einer neugeborenen (a), b) und einer 4 Tage alten Maus (c), d))

a): monoklonaler Antikörper mab 2
(10 μ g gereinigter Antikörper / ml)
b): Kontrolle (10 μ g/ml Ratten-IgG)

c) und d) : Doppelfärbung mit dem monoklonalen Antikörper mab 2 gegen BDNF (10 μ g gereinigter Antikörper / ml) und Antiserum gegen GFAP
c): mab 2 (FITC-Fluoreszenz)
d): GFAP (TRITC-Fluoreszenz)

a) und b) : 875x; c) und d) : 1460x.

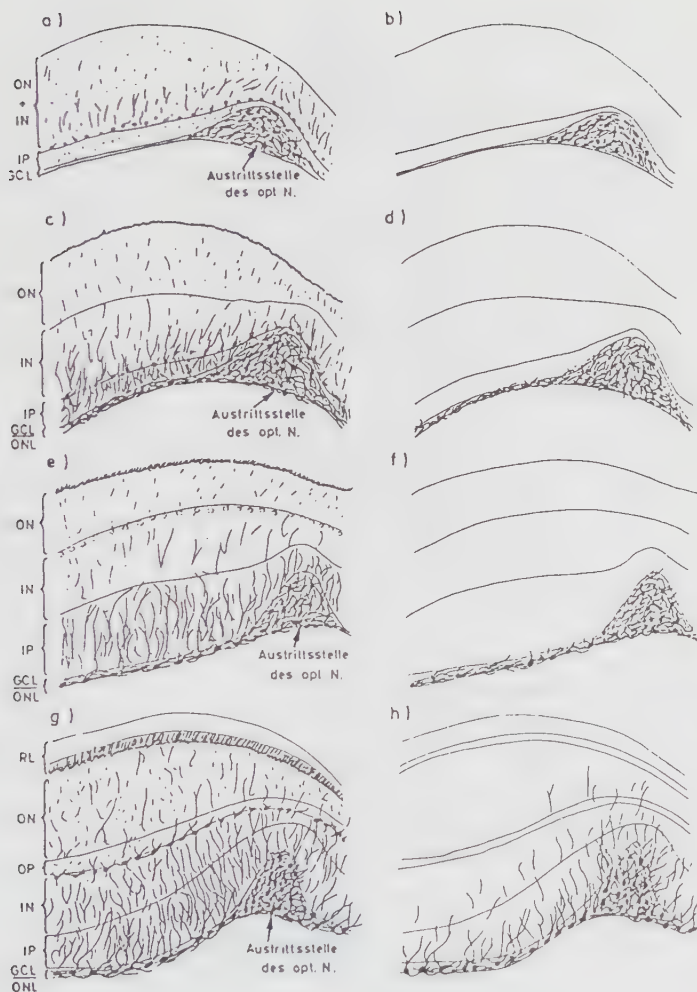
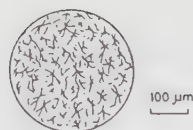


Fig. 24 : Färbung der Maus-Retina mit dem monoklonalen Antikörper mab 2 (a), c), e), g)) und dem Antiserum gegen GFAP (b), d), f), h)) im Verlauf der postnatalen Entwicklung. (Schemazeichnungen: Austrittsstelle des optischen Nerven jeweils halb angeschnitten)

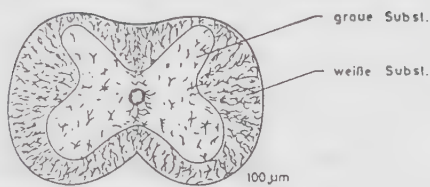
a) und b) : neugeborene Maus
 c) und d) : 4 Tage alte Maus
 e) und f) : 6 Tage alte Maus
 g) und h) : adulte Maus

(Abkürzungen siehe Fig. 22)

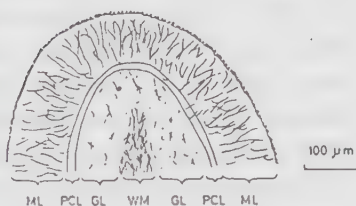
a) opt. Nerv



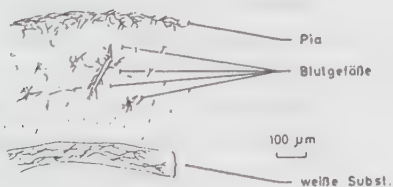
b) Rückenmark



c) Cerebellum



d) Neocortex



e) Retina



Fig. 25 : Färbung des Zentralnervensystems der Maus durch den monoklonalen Antikörper mab 2 (Schemazeichnungen mit unterschiedlichem Vergrößerungsmaßstab)

- a) : optischer Nerv
 b) : Rückenmark
 c) : *Cerebellum* (Abkürzungen siehe Fig. 16)
 d) : *Neocortex*
 e) : *Retina* (Abkürzungen siehe Fig. 22)

4. Diskussion

4.1. Spezifität der Antikörper

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Produktionsorte von BDNF im Zentralnervensystem durch indirekte Immunfluoreszenz mit monoklonalen Antikörpern nachzuweisen. Wie schon in Material und Methoden erwähnt, wurden die beiden verwendeten monoklonalen Antikörper (mab 1 und mab 2) nach Immunisierung mit einer partiell gereinigten, mit Glutaraldehyd polymerisierten Fraktion (Barde *et al.*, 1982) gewonnen, die etwa 1% BDNF enthielt. Im Immuno-dot test erkannten diese Antikörper zweifelsfrei den gereinigten BDNF; aber mab 2 reagierte außerdem noch mit Lysozym, einem ähnlich basischen Protein wie BDNF. Der eindeutige Nachweis, daß diese Antikörper außer BDNF nicht auch ein Vorläuferprotein oder ein Epitop auf einem anderen, von BDNF unabhängigen Antigen erkannten, hätte sich nur durch einen *Western blot* von Gewebeextrakten erbringen lassen. Mit beiden Antikörpern konnten jedoch keine spezifischen Färbungen auf *Western blots* erzielt werden.

Beide monoklonalen Antikörper mab 1 und mab 2, die offensichtlich unterschiedliche Epitope erkannten (s.o.), farbten in den ersten Experimenten dieselben Strukturen - d.h. Astrozyten - im Rückenmark und im optischen Nerven an, was darauf hindeutete, daß die Färbung spezifisch für BDNF oder einen BDNF-Vorläufer war. (Die Färbung mit mab 1, dem spezifischeren der beiden Antikörper, war in den ersten Experimenten von vornherein schwächer als die Färbung mit mab 2. Sie ließ sich in den

späteren Experimenten nicht mehr reproduzieren. Die Ursache dafür ist unbekannt. Es lag jedenfalls nicht an einer Mutation der Hybridomazellen. Daher habe ich in den Ergebnissen nur die Immunfluoreszenz-Färbungen von mab 2 dargestellt.> - Die Färbung war spezifisch für leicht (mit 0.4% Formaldehyd) fixierte Gewebe, bei stärkerer Fixierung oder Erwärmung der Schnitte auf >50 °C wurde wesentlich weniger angefärbt. Somit erkannten beide Antikörper nur ein leicht denaturiertes, kein natives Antigen. Daraus läßt sich erklären, daß beide monoklonalen Antikörper die biologische Aktivität von BDNF nicht blockieren und BDNF nicht durch Immunadsorption aus einer Lösung ausfällen konnten (Barde *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse). Ebenso gelang es nicht, die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung durch Vorinkubation von mab 2 mit BDNF (Molverhältnis 1:50, 1:320) aufzuheben (hier nicht gezeigte eigene Versuche). Die Antikörper erkannten BDNF auf Immuno-dot tests, nicht aber auf Western blots, wo Proteine wesentlich stärker denaturiert werden.

Die Färbung von mab 2 war allerdings spezifisch für diesen Antikörper : entsprechende (und auch höhere) Konzentrationen an Ratten-IgG ergaben nur eine ganz schwache unspezifische diffuse Hintergrundfärbung. Mab 1 und mab 2 reagierten auch eindeutig nicht (in mehreren Immuno-dot tests) mit GFAP, dem sauren Glia-Filament-Protein von Astrozyten. Die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung mit mab 2 war in den meisten Fällen schwächer als die GFAP-Färbung. Das lag wohl in erster Linie daran, daß der monoklonale Antikörper mab 2 weniger sensitiv war als das polyklonale GFAP-Antiserum. Außerdem war das mab 2-Antigen wahrscheinlich in geringerer Konzentration in den Astrozyten vorhanden als GFAP.

Die von mir verwendeten Antikörper sind monoklonal, erkennen also nur ein bestimmtes Epitop, das aber im Fall von mab 2 sowohl auf leicht denaturiertem BDNF als auch auf Lysozym zu finden ist. Lysozym, ein typischer Bestandteil von Extrazellulärflüssigkeiten (z.B. Speichel, Tränen, Blutplasma), das auch in Blutgefäßwänden vorkommt (Davies *et al.* 1983), wurde bisher nicht in Gliazellen nachgewiesen (siehe als *Review* : Jollès & Jollès 1984). In der Cerebrospinalflüssigkeit kann es unter pathologischen, nicht aber unter normalen Bedingungen auftreten (DiLorenzo *et al.* 1977; Gekle *et al.* 1977). Da mit mab 2 keine Hintergrundfärbung im Extrazellulärraum auftrat, ist diese Kreuzreaktion offenbar praktisch vernachlässigbar.

Somit kann es sich bei dem von mab 2 erkannten Antigen um denaturierten BDNF, um einen BDNF-Vorläufer oder um ein in seiner Konformation BDNF-ähnliches Protein handeln. Den völlig endgültigen Nachweis von BDNF können erst Antikörper erbringen, die die biologische Aktivität von BDNF hemmen können und die außerdem ausschließlich BDNF auf *Western blots* erkennen.

4.2. Markierte Zelltypen

Der Antikörper mab 2 markierte im optischen Nerven, im Rückenmark, im *Neocortex*, und im optischen *Tectum* von Maus und Ratte spezifisch Fortsätze und Zellkörper von GFAP-positiven Astrozyten, aber außerdem auch GFAP-negative Ependymzellen im Rückenmark und Müller-Gliazellen in der *Retina*. Durch den mab 2 - Antikörper wurden alle Populationen GFAP-positiver Zellen, d.h. sowohl

fibröse als auch protoplasmatische Astrozyten anfärbt.

Am stärksten markiert waren Fortsätze und Zellkörper fibröser Astrozyten in der weißen Substanz, die durch einen kleinen Zellkörper und durch lange relativ starke Fortsätze gekennzeichnet sind. Gut zu erkennen waren die Astrozyten-Endfüßchen um Gefäße und an der pia-arachnoidalen Hirnoberfläche, wo sie eine dichte *glia limitans* bildeten.

Protoplasmatische Astrozyten, die vor allem in der grauen Substanz vorkommen, und reaktive Astrozyten, die im denervierten optischen Nerven die hauptsächliche Zellpopulation ausmachen, wurden ebenfalls durch mab 2 markiert. Die normalen protoplasmatischen Astrozyten in der grauen Substanz ließen sich allerdings nur schwach anfärben. (Protoplasmatische Astrozyten haben einen größeren Zellkörper und kürzere Fortsätze als fibröse Astrozyten (Cajal 1913). Sie enthalten weniger GFAP (Bignami *et al.* 1972, 1980; siehe Duffy 1983, Kap. 1).) Die reaktiven Astrozyten im denervierten optischen Nerven (Dahl *et al.* 1981; Fulcrand & Privat 1977; Skoff 1975; Politis & Houle 1985; Vaughn *et al.* 1970; siehe als *Review*: Koeppen 1985) waren mit dem mab 2-Antikörper stärker gefärbt als im normalen Nerv. Die mab 2-Färbung war hier sogar intensiver als die mit dem GFAP-Antiserum.

Der monoklonale Antikörper mab 2 färbte sowohl voll ausdifferenzierte als auch noch nicht völlig differenzierte Gliazellen an. Beispielsweise wurden Bergmann-Gliazellen im *Cerebellum* der neugeborenen Maus gefärbt, die zu diesem Zeitpunkt noch kein GFAP produzierten. GFAP-positive Astrozyten im Rückenmark und im optischen Nerven wurden ebenfalls

bereits in der neugeborenen Maus von mab 2 markiert. Außerdem farbte dieser Antikörper von Geburt an Müllerzellen der *Retina*, die - außer nach Verletzungen - kein GFAP enthalten, sondern Vimentin (Bignami & Dahl 1979). Bergmann-Gliazellen und Müllerzellen sind ein Beispiel für radiale Gliazellen, die modifiziert noch beim adulten Tier vorhanden sind. Während der Entwicklung des Nervensystems treten radiale Gliazellen vorübergehend als Leitstrukturen für wandernde Neuronen und auswachsende Nervenfasern auf (siehe Rakic 1982 als *Review* : und Teil IV).

Das frühe Auftreten des mab 2-Antigens in der Entwicklung und das Ansteigen der mab 2-Immunoreaktivität nach Verletzung im optischen Nerven weist darauf hin, daß das mab 2-Antigen eine Rolle als Überlebensfaktor während der Entwicklung und bei Schädigungen des Nervensystems spielen könnte.

4.3. *Korrelation der Färbung mit neurotrophischer Aktivität*

In Teil II hatte ich die Konzentrationen neurotrophischer Aktivität in Extrakten verschiedener Regionen des Zentralnervensystems miteinander verglichen. Die neurotrophische Aktivität von Extrakten des optischen Nerven war besonders hoch und wurde dort von Gliazellen, nicht von Nervenzellen, produziert. Nach saurer Fällung war in Extrakten des optischen Nerven (30% der Proteine von Totalextrakten) auch eine neurotrophische Aktivität mit dem Molekulargewicht von BDNF enthalten, die aber nur ca. 20% der gesamten neurotrophischen Aktivität im optischen Nerven ausmachte. Es ist

daher klar, daß man von der totalen neurotrophischen Aktivität nicht einfach auf den BDNF-Gehalt rückschließen kann. Etwa 80% der neurotrophischen Aktivität im optischen Nerven wurden nach saurer Fällung durch ein Protein vom Molekulargewicht von 24 - 26 kD verursacht. Dieses Protein könnte ein aktiver Vorläufer von BDNF (der eventuell von mab 2 erkannt wird) und/oder ein anderer neurotrophischer Faktor sein. Es ist deshalb bemerkenswert, daß die Färbungsintensität und die Dichte der mab 2-positiven Zellen im optischen Nerven und in anderen Teilen des Zentralnervensystems sehr gut mit dem Gehalt an neurotrophischen Substanzen korrelierte. So war die Dichte der mab 2-positiven Astrozyten in der weißen Substanz immer stärker als in der grauen Substanz. Ähnlich war die Konzentration der neurotrophischen Aktivität im optischen Nerven größer als im Rückenmark, und dort wiederum wesentlich größer als im optischen Tectum oder im Gesamthirn.

Das weist darauf hin, daß ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit des mab 2-Antigens (- das BDNF, ein BDNF-Vorläufer oder ein in seiner Konformation BDNF-ähnliches Protein sein kann -) und der Konzentration an neurotrophischen Substanzen in verschiedenen Regionen des Zentralnervensystems bestehen könnte.

5. Zusammenfassung

Zwei monoklonale Antikörper gegen BDNF wurden durch Immunisierung einer Ratte mit einer partiell gereinigten, mit Glutaraldehyd polymerisierten Fraktion eines Schweinehirnextrakts (Barde *et al.* 1982) erhalten. Diese Antikörper erkannten BDNF auf Immuno-dot tests, nicht aber in Lösung oder auf Western blots. Einer der Antikörper reagierte auf dot tests auch mit Lysozym. Dieser Antikörper färbte auf leicht fixierten Schnitten des Zentralnervensystems von Ratte und Maus GFAP-positive Astrozyten und GFAP-negative Ependymzellen an, sowohl im adulten als auch im neugeborenen Tier. Die Astrozyten kamen am häufigsten in der weißen Substanz vor und waren dort am stärksten markiert. Im neonaten Cerebellum wurden auch Bergmann-Gliazellen angefärbt, die GFAP erst im Verlauf der postnatalen Entwicklung erwerben. In der Retina der Maus markierte der Antikörper Zellkörper und Fortsätze GFAP-positiver Astrozyten und GFAP-negativer Müllerzellen, ebenfalls bereits von Geburt an (Zusammenfassung der Ergebnisse in Fig. 25).

Wegen der Eigenschaften des Antikörpers konnte nicht geklärt werden, ob dieser Antikörper auf den Schnitten BDNF, ein BDNF-Vorläuferprotein, oder ein immunologisch kreuzreaktives, anderes Protein erkannte. Es bestand aber eine Korrelation zwischen der Dichte der gefärbten Zellen und Fortsätze und der Konzentration von neurotrophen Substanzen in den verschiedenen Regionen des Zentralnervensystems.

IV. BEDEUTUNG DER ERGEBNISSE VON TEIL II UND III

1. Rolle von Astrozyten bei Entwicklung und Regeneration

Glioblasten und Neuroblasten entstehen etwa gleichzeitig aus denselben Stammzellen (Matrixzellen) (Fujita 1963; Levitt *et al.* 1981, 1983; Raju *et al.* 1981; Schnitzer *et al.* 1984; Skoff *et al.* 1976; Smart & Leblond 1961). Die Glioblasten differenzieren sich weiter zu Stammzellen von Astrozyten und Oligodendrozyten. Unreife Astrozyten (radiale Gliazellen), die wenig oder gar kein GFAP exprimieren (Bovolenta *et al.* 1984; Valentino *et al.* 1983), bilden im *Neocortex* und im *Hippocampus* mit ihren radialen Fortsätzen eine Leitstruktur für von innen nach außen wandernde Neuronen und auswachsende Nervenfasern (Katz *et al.* 1983; Silver *et al.* 1982) und wandeln sich allmählich in reife Astrozyten um (Levitt & Rakic 1980; Pixley & DeVellis 1984; Schmechel & Rakic 1979). Im *Cerebellum* wandern die Körnerzellen von außen nach innen entlang der radialen Fasern der Bergmann-Gliazellen (auf deren Zellkörper zu) (Choi & Lapham 1980; Ghandour *et al.* 1983; Rakic 1971; Swarz & Oster-Granite 1978), die zu diesem Zeitpunkt noch kaum GFAP enthalten (Bovolenta *et al.* 1984; Choi & Lapham 1980).

Astrozyten bilden ein dichtes Netzwerk zwischen den Neuronen und den Nervenfaserbündeln. Fibrose und protoplasmatische Astrozyten bilden mit ihren Endfüßchen einerseits die dichte *glia limitans* um Gefäße und unter der pia-arachnoidalen

Hirnoberfläche (Bignami *et al.* 1972, 1980; Bullon *et al.* 1984; Landis & Reese 1982; siehe auch Duffy 1983, Kap. 1). Andererseits haben sie auch Kontakt zu Neuron-Zellkörpern, zu Dendriten, und zu Axonen (in der Region der Ranvier'schen Schnürringe und in der Synapsenregion) (J.A.Black *et al.* 1984; Mugnaini 1982; Raine 1984). Astrozyten sind untereinander, aber nicht mit Neuronen durch *gap junctions* verbunden (Mugnaini 1982; Waxman & Black 1984). - Es ist bekannt, daß Astrozyten das extrazelluläre Ionenmilieu durch die aktive Aufnahme von K⁺-Ionen kontrollieren (Walz *et al.* 1984; siehe als *Review*: Duffy 1983, Kap. 3; Hertz 1982). daß sie einen aktiven Aufnahmemechanismus für Transmitter wie GABA, Glutamat etc. besitzen (Hansson 1983; Levi *et al.* 1983; Wilkin *et al.* 1983; siehe Duffy 1983, Kap. 4), und daß sie bei Bedarf Glucose durch Spaltung von Glykogen an Neuronen weitergeben (siehe Bachelard 1983; Lund-Andersen 1979). Umfang, Natur und physiologische Bedeutung des Stoffaustausches zwischen Astrozyten und Neuronen ist noch weitgehend unbekannt (Arenander & DeVellis 1982; siehe Duffy 1983, Kap. 3 + 5; Hertz 1982; Varon & Sojmen 1979). Es konnte aber in mehreren Experimenten *in vitro* gezeigt werden, daß Astrozyten neurotrophische Substanzen produzieren (Banker 1980; Eagleson *et al.* 1985; Lindsay 1979; Lindsay *et al.* 1982; Müller *et al.* 1984; Varon *et al.* 1984). Das Überleben von Ganglienzellen der Retina, die auch auf BDNF reagieren (Johnson & Barde, unveröffentlichte Ergebnisse), wird *in vitro* entweder durch Substrat- gebundene Substanzen auf Astrozytenmembranen oder durch lösliche Substanzen, die von Neuronen des *Tectums* produziert werden, bewirkt (McCaffery *et al.* 1984; Nurcombe & Bennett 1981).

Auf Verletzung, Schädigung oder Zerstörung von Hirngewebe reagieren Astrozyten mit Proliferation und Hypertrophie, d.h. einer Vergrößerung des Zellkörpers, einer Vermehrung der Zellfortsätze, verstärkter Einlagerung von Glykogengranula und mit einer vermehrten Produktion von Vimentin (Bignami *et al.* 1980; Billingsley *et al.* 1982; Guth & Watson 1968; Latov *et al.* 1979; Politis & Houle 1985; Reisert *et al.* 1984; Vaughn *et al.* 1970). Diese Reaktion wird auch als Gliosis oder Astrozytosis bezeichnet, die beteiligten Zellen als reaktive Astrozyten (siehe Duffy 1983, Kap. 6). Nach dem Abbau von nekrotischem Gewebe durch Astrozyten und Makrophagen (Fulcrand & Privat 1977; Reisert *et al.* 1984; Vaughn *et al.* 1970; Wolinsky *et al.* 1982) bilden die Astrozyten ein engmaschiges Netzwerk, die sogenannte Glia-Narbe, die die verletzte Region ganz ausfüllt. Es konnte gezeigt werden, daß verletzte Hirngewebe lösliche neurotrophische Substanzen produzieren (Gage *et al.* 1984; Lindsay *et al.* 1982; Longo *et al.* 1984; Nieto-Sampedro *et al.* 1982, 1983, 1984; Politis 1985; Politis *et al.* 1983). Andererseits findet im ZNS keine Regeneration myelinisierter Nervenfasern statt, was vermutlich auf eine hemmende Substratwirkung von Oligodendrozyten zurückzuführen ist (Schwab & Thoenen 1985).

Astrozyten stehen also ständig mit Neuronen in Kontakt und Stoffaustausch. Sie reagieren auf schädigende und störende Einflüsse, und sie produzieren - zumindest unter *in vitro*-Bedingungen - neurotrophische Substanzen.

2. Mögliche physiologische Bedeutung von BDNF

Meine Experimente haben gezeigt, daß neurotrophische Substanzen im Zentralnervensystem unterschiedlich verteilt sind. Ihre Konzentration ist an höchsten in der weißen Substanz, wie z.B. im optischen Nerven. Die löslichen neurotrophischen Substanzen im optischen Nerven werden von Gliazellen produziert und bestehen nach saurer Fällung zu ca. 20% aus Protein vom Molekulargewicht 12 kD (möglicherweise zum größten Teil BDNF) und zu 80% aus Protein vom Molekulargewicht 24-26 kD. Dieses größere Protein könnte einen aktiven Vorläufer von BDNF oder einen anderen Faktor enthalten. Der monoklonale Antikörper mab 2, der BDNF und Lysozym auf Immuno-dot tests erkannte, färbte im Zentralnervensystem Astrozyten, Ependymzellen, und Müllerzellen an. Am stärksten gefärbt und am dichtesten verteilt waren Fortsätze von Astrozyten in der weißen Substanz. Es ergab sich eine Korrelation zwischen dem Gehalt an neurotrophischen Substanzen und der Dichte mab 2-positiver Zellen und Fortsätze in verschiedenen Regionen des Zentralnervensystems.

Diese Korrelation führte zu folgender Arbeitshypothese : Falls mab 2 ausschließlich BDNF oder ein BDNF-Vorläuferprotein erkennt (siehe II.4.1.), würde BDNF in den höchsten Konzentrationen in der weißen Substanz vorliegen. Demnach könnte erwartet werden, daß BDNF vor allem auf die Axone der weit projizierenden Neuronen wirkt. Damit würde übereinstimmen, daß BDNF auf Spinalganglien-Neuronen, das *Ganglion nodosum*, und auf Ganglienzellen der *Retina* wirkt. Das sind alles Neuronen mit langen Axonen, die in das ZNS

projizieren. Der optische Nerv, der von dem mab 2 - Antikörper besonders stark angefärbt wurde, enthält die Axone der *Retina*-Ganglienzellen. Allerdings umgeben die Müllerzellen, die ebenfalls stark mab 2-positiv waren, außer den *Retina*-Ganglienzellen auch die *Retina*-internen Schaltzellen (Bipolar-Zellen, amakrine Zellen etc.), sowie die Zellkörper der Photorezeptorzellen (Bignami & Dahl 1978; Bussow 1980; Cajal 1911). Die Bergmann-Gliazellen (Cajal 1911) in der Molekularschicht des *Cerebellums* wurden auch deutlich von dem mab 2-Antikörper angefärbt. Ihre Fasern verlaufen entlang der Dendriten der Purkinjezellen und der Axone der Körnerzellen. Beide Zelltypen projizieren nur innerhalb des *Cerebellums* (Cajal 1911; Palay & Chan-Palay 1974). Dies würde also auch der obigen Theorie widersprechen.

Astrozyten können alle zentralen Neuronen erreichen und kommen überall im Zentralnervensystem vor, wenn auch in unterschiedlicher Dichte. Im Gegensatz zu NGF, der in den Zielorganen NGF-abhängiger Neuronen produziert und dort von den Nervenendigungen aufgenommen und retrograd transportiert wird (siehe Schwab & Thoenen 1983; Thoenen & Barde 1980), konnte BDNF von den Neuronen entlang des gesamten Axons aufgenommen werden. Es war daher von großem Interesse, nachzuweisen, ob BDNF spezifisch von bestimmten Nervenzellen aufgenommen und retrograd transportiert wird. Bisher konnte für BDNF retrograder Transport nicht nachgewiesen werden, da es bisher nicht gelungen ist, BDNF hochspezifisch radioaktiv zu markieren, ohne daß die biologische Aktivität verloren ging. Wenn dies möglich sein wird (Leibrock & Barde, unveröffentlichte Ergebnisse), dann wird sich klären lassen, ob BDNF z.B. nur in der Region der Nervenendigungen

vorhanden sein muß, um einen Überlebensseffekt zu erzielen, wie das bei NGF der Fall ist (Campenot 1982; Claude *et al.* 1982). Außerdem lassen sich dann Neuronen auf das Vorhandensein von BDNF-Rezeptoren überprüfen, mit derselben Methode, die ich (in Teil V) für den Nachweis von NGF-Rezeptoren auf cholinergen Neuronen der *Nucleus basalis*-Region verwendet habe.

V. SPEZIFISCHE AUFNAHME UND RETROGRADER TRANSPORT
DES NERVENWACHSTUMSFAKTORS (NGF) VOM
NEOCORTEX ZU BASALEN VORDERHIRNKERNEN

1. Einführung und Fragestellung

Der Nervenwachstumsfaktor (NGF) ist notwendig für die Entwicklung und das Überleben sympathischer und einer Subpopulation sensorischer Neuronen im peripheren Nervensystem (siehe Harper & Thoenen 1981; Thoenen & Barde 1980). So bewirkt NGF *in vivo* und *in vitro* das Überleben sympathischer Neuronen, stimuliert das Auswachsen von Neuriten, und erhöht spezifisch die Produktion der Schlüsselenzyme der Noradrenalin-Synthese, Tyrosinhydroxylase (TH) und Dopamin- β -Hydroxylase (DBH). Injektion von NGF-Antikörpern in neugeborene Mägen führt zu einer Zerstörung des peripheren sympathischen Nervensystems (Harper & Thoenen 1981; siehe I.2.).

Im Zentralnervensystem konnten - im Gegensatz zum peripheren Nervensystem - keine Wirkungen von NGF oder NGF-Antikörpern auf catecholaminerge Neuronen gefunden werden, obwohl versucht wurde, solche Wirkungen während der normalen Entwicklung (Konkol *et al.* 1978; Menesini Chen *et al.* 1978; Schwab *et al.* 1979), Regenerationsvorgängen (Konkol *et al.* 1978), und an *in oculo* (Olson & Seiger 1976) und *in vitro* Explantaten (Coyle *et al.* 1973; Dreyfus *et al.* 1980; Olson *et al.* 1979) nachzuweisen.

Dieser Teil der Arbeit wurde (mit Zustimmung des Betreuers) veröffentlicht (M.Seiler & M.E.Schwab (1984): Specific retrograde transport of nerve growth factor (NGF) from neocortex to nucleus

Stereotaktische Injektionen von NGF oder NGF-Antikörpern in den *Locus coeruleus* oder in die *Substantia nigra* von adulten Ratten hatten keine Wirkung auf die TH-Aktivität (Schwab *et al.* 1979). Zudem konnte nach Injektion geringer Mengen von ^{125}I -markiertem NGF in den *Hippocampus* oder den *Nucleus caudatus* keine spezifische (Rezeptor-vermittelte) Aufnahme und kein retrograder Transport von ^{125}I -NGF in den *Locus coeruleus* oder in die *Substantia nigra* beobachtet werden. Folglich hat NGF wohl deswegen keine Wirkung auf zentrale aminerge Neuronen, weil ihnen NGF-Rezeptoren fehlen. Überraschenderweise wurde jedoch festgestellt, daß NGF vom *Hippocampus* retrograd in die großen cholinergen Neuronen im medialen *Septum*-Kern und im Kern des diagonalen Bandes von *Broca* transportiert wurde (Schwab *et al.* 1979). Aufnahme und Transport von NGF konnten ausschließlich im *septo-hippocampalen* System, aber nicht in anderen Afferenzen zum *Hippocampus* beobachtet werden. Markierte Neuronen waren auch schon nach Injektion sehr kleiner NGF-Mengen sichtbar, aber nicht nach Injektion von ^{125}I -Cytochrom c. Analog zu früheren Ergebnissen im peripheren Nervensystem weist eine solche Selektivität stark auf das Vorhandensein spezifischer Membranrezeptoren für NGF hin (Dumas *et al.* 1979; Stöckel *et al.* 1974, 1975).

Diese Schlußfolgerung wurde noch durch weitere Versuchsergebnisse bestärkt. Kurzlich konnte nachgewiesen werden, daß NGF die Aktivität der Cholinacetyltransferase (ChAT) in Nervenzellen aus dem Ratten- Vorderhirn *in vitro* (Gnahn *et al.* 1983; Honegger & Lenoir 1982) und *in vivo* (Gnahn *et al.* 1983) erhöht. Intracerebrale oder intraventrikuläre Injektion von NGF in neugeborene Ratten bewirkte ein signifikantes Ansteigen der ChAT-Aktivität im

Septum, *Hippocampus* und im *Neocortex*, aber nicht im Hirnstamm (Gnahn *et al.* 1983).

Zudem wird vermutet, daß NGF an dem Phänomen sowohl des *sympatho-hippocampalen* (Crutcher *et al.* 1981; Loy & Moore 1977) als auch des *sympatho-corticalen sprouting* (Crutcher 1981) beteiligt ist. Nach Zerstörung cholinergischer Afferenzen aus dem basalen Vorderhirn wachsen nämlich periphere sympathische Fasern, die normalerweise Blutgefäße innervieren und die auf NGF ansprechen (Bjerre *et al.* 1975a; Thoenen & Barde 1980), in den *Hippocampus* bzw. den *Neocortex* ein.

Es ist eindeutig, daß NGF nicht nur im *septo-hippocampalen* System, sondern auch im *Nucleus basalis-Neocortex*-System spezifisch die ChAT-Aktivität ansteigen läßt (Gnahn *et al.* 1983). Daher sollte untersucht werden: Wird 125 I-markierter NGF auch von den cholinergen Nervenendigungen im *Neocortex* spezifisch (Rezeptor-vermittelt) aufgenommen und retrograd zu den Zellkörpern der *Nucleus basalis*-Region transportiert? - Die Spezifität des Transports sollte durch Injektion äquimolarer Mengen 125 I-Cytochrom c nachgewiesen werden. Cytochrom c ist mit NGF in seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften vergleichbar, wird aber weder von den Nervenendigungen aufgenommen noch retrograd transportiert (Stöckel *et al.* 1974). - Zugleich sollten diese Experimente die Grundlage bilden, um später mit dem retrograden Transport von 125 I-markiertem BDNF im ZNS vergleichen zu können.

2. Material und Methoden

2.1. Markierung mit ^{125}I

2.5 S (β -)NGF wurde aus Speicheldrüsen adulter männlicher Mäuse nach einer Modifikation der Methode von Bocchini & Angeletti (Suda *et al.* 1978) gereinigt und nach der Chloramin-T - (Stöckel *et al.* 1975) oder der Lactoperoxidase - Methode (Rohrer & Barde 1982) mit ^{125}I jodiert. Beide Methoden erhielten die biologische Aktivität von NGF (hier nicht gezeigt) und ergaben vergleichbare Proteinkonzentrationen von 22 - 33 ng/ml und spezifische Aktivitäten von 88 - 115 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. Cytochrom c (Sigma) wurde nach der Chloramin-T - Methode jodiert. (spez. Akt. 48 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$; Proteinkonzentration 12 ng/ml).

2.2. Stereotaktische Injektionen

Nach Betäubung mit Nembutal (20 mg/kg) wurden die Tiere in einen stereotaktischen Apparat (LPC, Paris) eingespannt. Mit einer Glaskapillare (Spitzendurchmesser 4 - 8 μm) wurden 0.2 - 0.4 μl ^{125}I -NGF (entspr. 4 - 13 ng) oder Cytochrom c über eine Zeit von 5 - 10 Minuten injiziert. Folgende Injektionsstellen wurden gewählt (topographische Bezeichnungen der Cortex-Gebiete nach Krieg 1946): frontaler Cortex (5 Ratten für ^{125}I -NGF, 2 Ratten für ^{125}I -Cytochrom c; Koordinaten: A <Abstand vom bregma> + 2.5 mm; L <Abstand von der Mittellinie> 2.5 mm; D <Tiefe; von der Cortexoberfläche aus gemessen> 0.3 - 0.7 mm); dorsaler anteriorer Occipital-Cortex (6 Ratten für ^{125}I -NGF, 2 Ratten für ^{125}I -Cytochrom c; A - 4.5; L 3.0; D 0.4 - 0.5); oder caudaler Hippocampus (2 Ratten für ^{125}I -NGF, 2 Ratten für ^{125}I -Cytochrom c; A - 5.2; L 2.5; D 2.2). Die Koordinaten wurden nach dem Ratten-Hirnatlas von Koenig & Klippel (1974) ausgewählt und in vorhergehenden Experimenten durch Farbstoffinjektionen überprüft. Die Injektionsstellen in den Neocortex sind schematisch in Fig. 26 gezeigt. Insgesamt wurden für alle Experimente 19 erwachsene weibliche WISTAR-Ratten mit einem Körpergewicht von 200g verwendet.

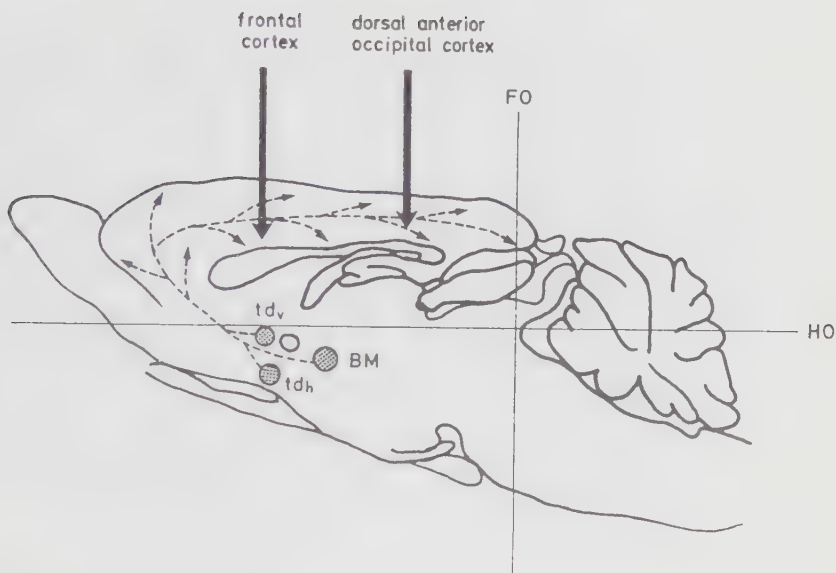


Fig. 26 : Schematische Darstellung der Injektionsstellen in den frontalen *Cortex* und in den dorsalen anterioren *Occipital-Cortex* (topographische Bezeichnungen nach Krieg 1946) und ihre Beziehung zu den bekannten cholinergen Afferenzen zum *Neocortex* (siehe Bigl *et al.* 1982; Eckenstein & Sofroniew 1983; Fibiger 1982; Johnston *et al.* 1981; Lamour *et al.* 1984; McKinney *et al.* 1983; Mezulam *et al.* 1983; Rye *et al.* 1984; Wenk *et al.* 1980; Woolf *et al.* 1983).

BM = *Nucleus basalis magnocellularis*
(*Nucleus basalis*-Region)

td_h = horizontaler Teil des Kerns des diagonalen Bandes
td_v = vertikaler " " " " " "

F 0 = frontale Null-Ebene (nach König & Klippel 1974)

H 0 = horizontale Null-Ebene (nach König & Klippel 1974)

2.3. Autoradiographie

24 Stunden nach der Injektion von ^{125}I -NGF bzw. ^{125}I -Cytochrom c wurden die Tiere in tiefer Äther-Narkose durch die linke Herzkammer mit einer Lösung von 4% Formaldehyd in 0.1M Phosphatpuffer (pH 7.4) perfundiert (Perfusionsprozedur siehe III.2.2.). Die Gehirne wurden herausseziert, für einen Tag in demselben Fixativ gelagert, dann dehydriert (aufsteigende Alkoholreihe, Methylsalicylat, Xylol) und in Paraffin eingebettet. Die Dehydrierung dauerte etwa eine Woche. Mit einem LEITZ-Mikrotom wurden Serienquerschnitte in einer Dicke von 10 - 15 μm hergestellt. Die Schnitte wurden auf gelatinisierte Objektträger geklebt, deparaffiniert (Xylol, absteigende Alkoholreihe) und mit ILFORD K2- oder K5-Emulsion bedeckt. Nach einer Expositionszeit von einem Monat bei 4 °C wurden die Autoradiogramme mit dem KODAK D19-Entwickler entwickelt (4 Minuten), mit 24% Natrium-Thiosulfat fixiert (5 Minuten), ge- und entwässert, in ENTELLAN eingebettet und mit einem LEITZ - ORTHOPLAN - Mikroskop unter Dunkelfeld- und Phasenkontrast-Beleuchtung ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Injektionsstellen

Die Ausbreitung von ^{125}I -NGF oder ^{125}I -Cytochrom c an der Injektionsstelle war immer auf 1 - 2 mm beschränkt. Für ^{125}I -NGF sind typische Beispiele von Injektionsstellen in den frontalen *Cortex* und in den dorsalen anterioren *Occipital-Cortex* in Fig. 27a und in Fig. 28i gezeigt. In der unmittelbaren Umgebung der Injektionsstelle waren jedesmal unspezifisch (mit ^{125}I -NGF oder ^{125}I -Cytochrom c) markierte Zellen zu sehen.

Markierte Zellen nach Injektion in den frontalen Cortex

Nach Injektion von ^{125}I -NGF in den frontalen *Cortex* waren - ausschließlich ipsilateral zur Injektionsstelle - verstreut im lateralen präoptischen Kern, im anterioren lateralen *Hypothalamus*-Kern, der *Substantia innominata*, dem ventralen *Globus pallidus* und der *Capsula interna* Zellen stark markiert (Fig. 27b-e). Diese markierten Zellen waren typischerweise groß und multipolar (Fig. 29a). In dieser Lokalisierung sind solche Zelltypen charakteristisch für die cholinergen Zellen der Struktur, die dem *Nucleus basalis* von Meynert höherer Säugetiere entspricht (Divac 1975; Fibiger 1982; Kimura *et al.* 1981; Mesulam *et al.* 1983a,b, 1984; Sofroniew *et al.* 1982). In *Cortex*-Gebieten außerhalb der Injektionsstelle konnten keine markierten Zellen gefunden werden, obwohl es im

Neocortex intrinsische cholinerge Interneuronen gibt (Eckenstein & Thoenen 1983; Houser *et al.* 1983; Johnston *et al.* 1981; Levey *et al.* 1984). Im medialen *Septum*-Kern (der nur zum *Hippocampus* projiziert) und im Kern des diagonalen Bandes von *Broca* konnten nach Injektion von ^{125}I -NGF in den frontalen *Cortex* keine markierten Zellen gefunden werden. Ebenso wenig waren Zellen markiert im *Thalamus* und in den aminergen Kernen des Hirnstamms, die zum *Neocortex* projizieren, (d.h. im *Locus coeruleus*, dem dorsalen und medialen *Raphe*-Kern, der *Substantia nigra* oder dem ventralen *Tegmentum*-Gebiet).

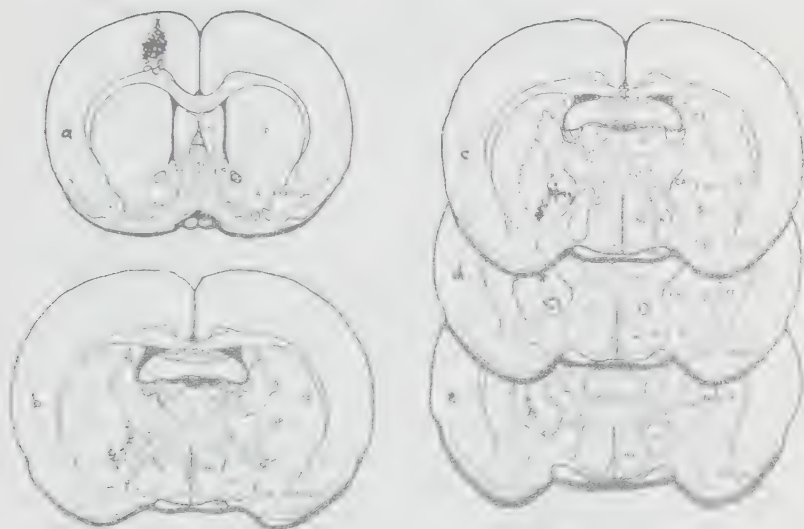


Fig. 27 : Injektionsstelle (a) und Topographie (b-e) retrograd markierter Zellkörper nach einer Injektion von ^{125}I -NGF (6.1ng, 0.5 μCi) in den frontalen Cortex: Serienschritte (von rostral nach caudal), nach Koenig & Klippel (1974).

* = stark markierte Zellen

o = mäßig markierte Zellen

Abkürzungen : a = *Nucleus accumbens*; CA = vordere Commissur; CAI = *Capsula interna*; CC = *Corpus callosum*; cp = *Nucleus caudatus putamen*; CO = Kreuzung der optischen Nerven; ep = *Nucleus entopeduncularis*; GP = *Globus pallidus*; ha = anteriorer *Hypothalamus*-Kern; HI = *Hippocampus*; hl = lateraler *Hypothalamus*-Kern; ms = medialer *Septum*-Kern; pol = lateraler präoptischer Kern; pom = medialer präoptischer Kern; SI = *Substantia innominata*; sl = lateraler *Septum*-Kern; tdh = horizontaler Teil des Kerns des diagonalen Bandes; tdv = vertikaler Teil des Kerns des diagonalen Bandes; TO = optischer Trakt.

3.3. Markierte Zellen nach Injektion in den dorsalen anterioren Occipitalcortex

Nach Injektion von ^{125}I -NGF in den dorsalen anterioren *Occipital-Cortex* wurden - hauptsächlich ipsilateral, aber auch kontralateral zur Injektionsstelle - Zellen im vertikalen und horizontalen Teil des Kerns des diagonalen Bandes von *Broca* (Fig. 28 a-c, Fig. 29c) markiert. Auf der kontralateralen Seite waren im Kern des diagonalen Bandes nur einige wenige markierte Zellen zu sehen (Fig. 28a-c). Außerdem waren - ausschließlich ipsilateral - Zellen in der *Nucleus basalis*-Region markiert (Fig. 28c-h, Fig. 29d). Wiederum hatten keine Zellen in anderen Kernen oder anderen Hirnregionen, die zum *Neocortex* projizieren, ^{125}I -NGF aufgenommen und retrograd transportiert, ebenso waren keine intrinsischen cholinergen *Cortex*-Interneuronen markiert.



Fig. 28 : Topographie der Injektionsstelle (i) und retrograd markierter Zellen (a-h) nach Injektion von ^{125}I -NGF (4.4 ng, 0.5 μCi) in den dorsalen anterioren Occipital-Cortex. Abkürzungen siehe Fig. 27.

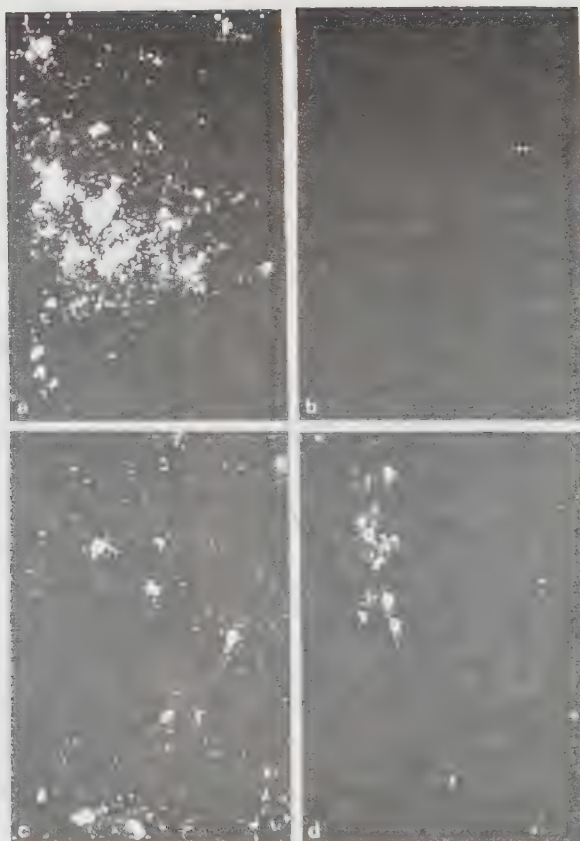


Fig. 29 : Dunkelfeld-Aufnahmen von radioaktiv markierten Zellen nach retrogradem Transport von ^{125}I -NGF.

a) : markierte Zellen in der ventralen *Capsula interna* (Region entsprechend Fig. 27c) nach Injektion von ^{125}I -NGF in den frontalen *Cortex*.

b) : identische Region wie in Fig. 29a nach Injektion von ^{125}I -Cytochrom c in den frontalen *Cortex*. Keine markierten Zellen in der ventralen *Capsula interna*.

c) : Injektion von ^{125}I -NGF in den dorsalen anterioren *Occipital-Cortex*. Markierte Zellen im vertikalen Teil des Kerns des diagonalen Bandes von Broca (Region entsprechend Fig. 28a).

d) : markierte Zellen in der ventralen *Capsula interna* (Region entsprechend Fig. 28g) nach Injektion von ^{125}I -NGF in den dorsalen anterioren *Occipital-Cortex*.

3.4. *Markierte Zellen nach Injektion in den caudalen Hippocampus*

Injektion von ^{125}I -NGF in den caudalen *Hippocampus* bestätigte frühere Ergebnisse von Schwab *et al.* (1979). Stark markiert wurden Zellen im medialen *Septum*-Kern und im Kern des diagonalen Bandes. In diesen Kernen waren einige markierte Neuronen auch kontralateral zur Injektionsstelle zu sehen, was auf eine teilweise gekreuzte Projektion hinwies (hier nicht gezeigt). Völlig unmarkiert blieben der *Entorhinale Cortex*, der kontralaterale *Hippocampus* und die aminergen Hirnstamm-Kerne, die wichtigsten *Input*-Systeme zum *Hippocampus*.

3.5. ^{125}I -Cytochrom c

Nach Injektion äquimolarer Mengen von ^{125}I -Cytochrom c in den frontalen *Cortex* und/oder den dorsalen anterioren *Occipital-Cortex* enthielt keine der Zellgruppen, die durch retrograden Transport von ^{125}I -NGF markiert worden waren, erkennbare Radioaktivitätsmengen. Außerdem wurde auch keine andere bekannte Projektion zu den Injektionsgebieten sichtbar. Somit wurde ^{125}I -Cytochrom c (bei den hier verwendeten Konzentrationen) nicht erkennbar von den Nervenendigungen aufgenommen und retrograd transportiert.

4. Diskussion

Zwei Eigenschaften des beobachteten retrograden Transports von 125 I-NGF von *Neocortex*-Gebieten zu den *Septum*- und *Nucleus basalis*-Regionen des basalen Vorderhirns sind bemerkenswert: Die Selektivität und die topographische Organisation.

4.1. Selektivität von NGF-Aufnahme und Transport

Es gibt drei Argumente für die Selektivität der Aufnahme und des retrograden Transports von 125 I-NGF: - (1) Konzentrationen und Gesamtmengen des injizierten NGF waren sehr klein. Es war etwa 10 - 1000 mal weniger, als für eine erfolgreiche Markierung mit Meerrettichperoxidase (HRP) injiziert werden muß (Divac 1975; Henderson 1981; Lamour *et al.* 1984). - (2) 125 I-Cytochrom c, ein Polypeptid mit ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften wie NGF, markierte nach Injektion in aquimolaren Mengen keine der Neuronen retrograd, die bekannterweise zu den Injektionsstellen projizieren. - (3) Die retrograde Markierung durch 125 I-NGF war anatomisch auf die kortikalen Afferenzen von den magnozellulären Kernen im basalen Vorderhirn beschränkt, d.h. auf den Kern des diagonalen Bandes von *Broca* und auf das Hirngebiet, das dem basalen *Meynert*-Kern bei höheren Säugetieren entspricht. Die Kerne enthalten cholinerge Neuronen, wie durch Immunhistochemie mit Antikörpern gegen Cholinacetyltransferase (ChAT) nachgewiesen wurde (Fibiger 1982; Kimura *et al.* 1981; Mesulam *et al.* 1983a; Ross *et al.* 1983; Rye *et al.* 1984; Sofroniew *et al.* 1982), und sie weisen eine starke Acetylcholinesterase (AChE)-Färbung auf (Bigl *et al.* 1982;

Johnston *et al.* 1981; McKinney *et al.* 1983; Shute & Lewis 1967; Woolf *et al.* 1983; Wenk *et al.* 1980). Die Markierung war spezifisch für weit projizierende cholinerge Neuronen : die intrinsischen cholinergen Interneuronen des *Neocortex* (Eckenstein & Thoenen 1983; Houser *et al.* 1983; Johnston *et al.* 1981; Levey *et al.* 1984) waren nicht markiert.

Im peripheren Nervensystem hing eine solche molekulare und anatomische Selektivität des retrograden Transports nach Injektion von ^{125}I - oder HRP- markiertem NGF direkt und verlässlich mit dem Vorhandensein von spezifischen NGF-Membranrezeptoren auf den Nervenendigungen der retrograd markierten Neuronen zusammen (Dumas *et al.* 1979; Stöckel *et al.* 1974, 1975). Eine definierte biochemische Antwort auf NGF, die spezifische Induktion der Cholinacetyltransferase (ChAT), konnte an foetalem oder neugeborenem *Septum*, *Hippocampus* und *Cortex* sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden (Ghahn *et al.* 1983; Honegger & Lenoir 1982). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß funktionelle NGF-Rezeptoren auch auf zentralen cholinergen Vorderhirn-Neuronen vorhanden sind.

4.2. Topographische Organisation

Nach Injektion von ^{125}I -NGF in den frontalen *Cortex* wurden in der *Nucleus basalis*-Region und im Kern des diagonalen Bandes von *Broca* andere Zellen markiert als nach Injektion in den dorsalen anterioren *Occipital-Cortex*. Zellen, die zu der Injektionsstelle im frontalen *Cortex* projizierten, wurden in den weiter caudalen Teilen des *Nucleus basalis* lokalisiert; d.h. entlang des lateralen *Hypothalamus*-Kernes, in der *Substantia innominata*,

im ventralen *Globus pallidus* und entlang der *Capsula interna*. Diese Projektion ist ausschließlich unilateral. Andererseits wurden nach Injektion von ^{125}I -NGF in den dorsalen anterioren *Occipital-Cortex* Zellen im gesamten Bereich der *Nucleus basalis*-Region und außerdem Zellen im Kern des diagonalen Bandes von *Broca* markiert. Im Kern des diagonalen Bandes konnten gelegentlich auch einige markierten Zellen auf der kontralateralen Seite beobachtet werden.

Eine unterschiedliche Organisation der Projektionen vom *Nucleus basalis* und vom Kern des diagonalen Bandes zu verschiedenen Regionen des *Neocortex* wurde in mehreren Tierarten (Rhesus-Affe, Katze, Ratte) mit den Methoden der retrograden Markierung oder durch Läsionen, kombiniert mit ChAT-Immunhistochemie oder AChE-Färbung gezeigt (Bigl *et al.* 1982; Fibiger 1982; Hartgraves *et al.* 1982; Henderson 1981; Jacobowitz & Creed 1983; Johnston *et al.* 1981; Lamour *et al.* 1984; Mayo *et al.* 1984; Mesulam *et al.* 1983a,b, 1984; Pearson *et al.* 1983; Price & Stern 1983; Ross *et al.* 1983; Sofroniew *et al.* 1982; Wenk *et al.* 1980; Woolf *et al.* 1983). Diese Ergebnisse stimmen mit den hier vorgelegten Beobachtungen gut überein, die gezeigt haben, daß nach Injektionen des frontalen *Cortex* mehr die caudalen Teile des *Nucleus basalis* markiert werden, und daß nach Injektionen des *Occipital-Cortex* zusätzlich noch der Kern des diagonalen Bandes markiert wird. Ebenfalls entsprechend früherer anatomischer Befunde (Schwab *et al.* 1979) konnten zum *Hippocampus* projizierende cholinerge Zellen nur im medialen *Septum*-Kern und im Kern des diagonalen Bandes von *Broca* gefunden werden.

4.3. *Physiologische Bedeutung*

Die physiologische Bedeutung von NGF-Rezeptoren auf diesen Neuronen des basalen Vorderhirns ist noch unbekannt. Kürzlich konnten Dr. Sigrun Korsching und Georg Auburger (MPI f. Psychiatrie/ Abt. Neurochemie) mit Hilfe eines hochempfindlichen zwei-seitigen Enzym-Immuntests für NGF nachweisen, daß signifikante Konzentrationen von NGF im *Hippocampus* und im *Neocortex* vorhanden sind. Die Konzentration von NGF war im *Hippocampus* und im *Neocortex* am höchsten von allen untersuchten Gehirnteilen. Ebenso konnte Dr. Rolf Heumann durch Hybridisierung von *Hippocampus*- und *Cortex*-mRNA mit NGF-spezifischer cRNA zeigen, daß NGF im *Hippocampus* und im *Cortex* produziert wird (Korsching *et al.* 1985). Zukünftige Aufgabe wird es sein, - ähnlich wie im peripheren Nervensystem - im Zentralnervensystem einen Einfluß von NGF bzw. NGF-Antiserum auf die Entwicklung dieser weit projizierenden cholinergen Neuronen nachzuweisen. Außerdem könnte man am Tiermodell untersuchen, ob NGF die Regenerationskapazität dieser Neuronen erhöht. Einen Hinweis auf einen metabolischen Effekt von NGF auf magnozelluläre cholinerge Neuronen konnten Hefti *et al.* kürzlich finden: nach chronischer NGF-Behandlung adulter Ratten mit teilweiser Läsion der *septo-hippocampalen Fimbria* konnte die ChAT-Aktivität im *Hippocampus* signifikant erhöht werden. NGF bewirkte allerdings kein *sprouting* der verbliebenen *septohippocampalen* Neuronen. NGF hatte also nur einen Effekt auf die Transmitterproduktion und erhöhte die Regenerationsfähigkeit dieser Neuronen nicht (Hefti *et al.* 1984).

5. Zusammenfassung

Mit ^{125}I markierter Nervenwachstumsfaktor (NGF) wurde in sehr kleinen Mengen in den frontalen *Cortex* oder in den dorsalen anterioren *Occipital-Cortex* adulter Ratten injiziert. Mit Hilfe von lichtmikroskopischer Autoradiographie konnte dann nachgewiesen werden, daß ^{125}I -NGF ausschließlich von den großen, bekanntermaßen cholinergen Neuronen der *Nucleus basalis*-Region (Zellkörper im lateralen präoptischen Kern, im anterioren lateralen *Hypothalamus*-Kern, der *Substantia innominata*, im ventralen *Globus pallidus* und der *Capsula interna*) sowie des Kerns des diagonalen Bandes von *Broca* spezifisch aufgenommen und retrograd transportiert worden war. Nach Injektion von ^{125}I -NGF in den frontalen *Cortex* wurden ipsilateral Zellen im mehr caudalen Teil der *Nucleus basalis*-Region markiert. Dagegen wurden Zellen, die zum dorsalen anterioren *Occipital-Cortex* projizierten, ipsilateral im gesamten Bereich der *Nucleus basalis*-Region gefunden und außerdem ipsi- und kontralateral im vertikalen und horizontalen Teil des Kerns des diagonalen Bandes von *Broca*. Andere Afferenzen zum *Neocortex* (*Locus coeruleus*, *Substantia nigra*, *Raphe*-Kern, *Thalamus*) blieben immer unmarkiert. Injektion von ^{125}I -Cytochrom c führte - im Gegensatz zu ^{125}I -NGF - nicht zu einer Markierung basaler Vorderhirnkerne durch retrograden Transport. Diese hochselektive Aufnahme und der retrograde Transport von ^{125}I -NGF weisen darauf hin, daß auf den cholinergen Neuronen, die den *Neocortex* innervieren, - ebenso wie auf den zum *Hippocampus* projizierenden cholinergen Neuronen (Schwab *et al.* 1979) - hochaffine Rezeptoren für NGF vorhanden sind.

LITERATURVERZEICHNIS

- Aguilar, C.E., Bisby, M.A., Cooper, E. and Diamond, J. (1973): Evidence that axoplasmic transport of trophic factors is involved in the regulation of peripheral nerve fields in salamanders. *J. Physiol. (Lond.)* 234: 449-464
- Aloe, L. and Levi-Montalcini, R. (1979): Nerve growth factor-induced transformation of immature chromaffin cells *in vivo* into sympathetic neurons: effect of antiserum to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1246-1250
- Aloe, L., Cozzari, C., Calissano, R. and Levi-Montalcini, R. (1981): Somatic and behavioral postnatal effects of fetal injections of nerve growth factor antibodies in the rat. *Nature (Lond.)* 291: 413-415
- Arenander, A.T. and DeVellis, J. (1982): Glial-released proteins in neural intercellular communication: molecular mapping, modulation, and influence on neuronal differentiation. In: B. Haber, J.R. Perez-Polo and J.D. Coulter (eds.): *Proteins in the Nervous System*: A. Liss, New York; Vol. 79: pp 243-269
- Bachelard, H.S. (1983): Transport of hexoses and monocarboxylic acids. In: A. Lajtha (ed.): *Handbook of Neurochemistry* (2nd ed.); Plenum Press, New York; Vol. 5: pp 339-354
- Bandtlow, C.E., Schwab, M.E., Heumann, R., Scott, J. and Thoenen, H. (1984): Localization of nerve growth factor (NGF) mRNA in cultured rat iris cells by *in-situ* hybridization. *Neurosci. Lett. Suppl.* 18: S304 (Abstr.)
- Banker, G. (1980): Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science* 209: 809-810
- Barbin, G., Manthorpe, M. and Varon, S. (1984): Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor. *J. Neurochem.* 43: 1468-1478
- Barde, Y.-A., Edgar, D. and Thoenen, H. (1980): Sensory neurons in culture: changing requirements for survival factors during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1199-1203
- Barde, Y.-A., Edgar, D. and Thoenen, H. (1982): Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1: 549-553
- Barde, Y.-A., Edgar, D. and Thoenen, H. (1983): Neurotrophic factors. *Ann. Rev. Physiol* 45: 601-612

- Barde, Y.-A., Lindsay, R.M., Monard, D. and Thoenen, H. (1978): New factor released by cultured glioma cells supporting survival and growth of sensory neurons. *Nature (Lond.)* 274: 818
- Barth, E.-M., Korsching, S. and Thoenen, H. (1984): Regulation of nerve growth factor synthesis and release in organ cultures of rat iris. *J. Cell Biol.* 99: 839-843
- Bennett, M.R., Lai, K. and Nurcombe, V. (1980): Identification of embryonic motoneurons *in vitro*: their survival is dependent on skeletal muscle. *Brain Res.* 190: 537-542
- Berg, D.K. (1984): New neuronal growth factors. *Ann. Rev. Neurosci.* 7: 149-170
- Bigl, V., Woolf, N.J. and Butcher, L.L. (1982): Cholinergic projections from the basal forebrain to frontal, parietal, temporal, occipital and cingulate cortices: a combined fluorescent tracer and acetylcholinesterase analysis. *Brain Res. Bull.* 8: 727-749
- Bignami, A. and Dahl, A. (1979): The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to GFAP. *Exp. Eye Res.* 28: 63-69
- Bignami, A., Dahl, D., and Rueger, D.C. (1980): Glial fibrillary acidic protein (GFA) in normal neural cells and in pathological conditions. *Adv. Cell. Neurobiol.* 1: 285-310
- Bignami, A., Eng, L.F., Dahl, D. and Uyeda, C.T. (1972): Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.* 43: 429-435
- Billingsley, M.L., Straw, J.A. and Mandel, G. (1982): Glial DNA synthesis and cell proliferation in the lesioned frontal cortex of the rat. *Brain Res.* 247: 325-334
- Bittner, G.D. (1981): Trophic interactions of CNS giant-axons in crayfish. *Comp. Bioch. Physiol.* 68: 299-306
- Bjerre, B., Björklund, A., Mobley, W. and Rosengren, E. (1975a): Short- and long-term effects of nerve growth factor on the sympathetic nervous system in the adult mouse. *Brain Res.* 94: 263-277
- Bjerre, B., Wiklund, L. and Edwards, D.C. (1975b): A study of de- and regenerative changes in the sympathetic nervous system of the adult mouse after treatment with the antiserum to nerve growth factor. *Brain Res.* 92: 257-278

- Black, I.B., Adler, J.E., Dreyfus, C.F., Jonakait, G.M., Katz, D.M., LaGamma, E.F. and Markey, K.M. (1984): Neurotransmitter plasticity at the molecular level. *Science* 225: 1266-1270
- Black, J.A., Waxman, S.G., and Hildebrand, C. (1984): Membrane specialization and axo-glial association in the rat retinal nerve fibre layer: freeze-fracture observations. *J. Neurocytol.* 13: 417-430
- Bocchini, V. and Angeletti, P.U. (1969): The nerve growth factor: purification as a 30,000-molecular weight protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64: 787-794
- Bovolenta, P., Liem, R.K.H. and Mason, C.A. (1984): Transitions in the form and cytoskeletal content of cerebellar astroglia *in vivo*. *Dev. Biol.* 102: 248-259
- Brunso-Bechtold, J.K. and Hamburger, V. (1979): Retrograde transport of nerve growth factor in chicken embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1494-1496
- Bueker, E.D. (1948): Implantation of tumours in the hind limb field of the embryonic chick and the developmental response of the lumbosacral nervous system. *Anat. Rec.* 102: 369-389
- Büssow, H. (1980): The astrocytes in the *retina* and optic nerve head of mammals: A special glia for the ganglion cell axons. *Cell Tissue Res.* 206: 367-378
- Bullon, M.M., Alvarez-Gago, T., Fernandez-Ruiz, B. and Aguirre, C. (1984): Glial fibrillary acidic (GFA) protein in rat spinal cord. An immunoperoxidase study in semithin sections. *Brain Res.* 309: 79-83
- Cajal, S.R.y (1909, 1911): *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Maloine, Paris; 2 vols.
- Cajal, S.R.y (1913): Sobre un nuevo proceder de impregnación de la neuroglia y sus resultados en los centros nerviosos del hombre y animales. *Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madr.* 11: 219-237
- Campenot, R.B. (1977): Local control of neuritic development by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 4516-4519
- Campenot, R.B. (1982): Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. - I. Local control of neurite growth by nerve growth factor. *Dev. Biol.* 93: 1-12.
- Choi, B.H. and Lapham, L.W. (1980): Evolution of Bergmann glia in developing human fetal *cerebellum*: A Golgi, electron microscopic and immunofluorescence study. *Brain Res.* 190: 369-383

- Chun, L.L.Y. and Patterson, P.H. (1977): The role of nerve growth factor in the development of rat sympathetic neurons *in vitro*. - I. Survival, growth and differentiation of catecholamine production. *J. Cell Biol.* 75: 694-704
- Claude, P., Hawrot, E., Dunis, D.A. and Campenot, R.B. (1982): Binding, internalization, and retrograde transport of 125 I-nerve growth factor in cultured rat sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 2: 431-442
- Cohen, S. (1960): Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46: 302-311
- Constantine-Paton, M. (1982): The retinotectal hookup : The process of neural mapping. In: *Developmental Order : Its Origin and Regulation*; A. Liss, New York; pp 317-349
- Coughlin, M.D. (1984): Growth factors regulating autonomic nerve development. *Adv. Cell. Neurobiol.* 5: 53-112
- Cowan, W.M., Fawcett, J.W., O'Leary, D.D.M. and Stanfield, B.B. (1984): Regressive events in neurogenesis. *Science* 225: 1258-1265
- Coyle, J.T., Jacobowitz, D., Klein, D. and Axelrod, J. (1973): Dopaminergic neurons in explants of substantia nigra in culture. *J. Neurobiol.* 4: 461-470
- Crutcher, K.A. (1981): Cholinergic denervation of rat *neocortex* results in sympathetic innervation. *Exp. Neurol.* 74: 324-329
- Crutcher, K.A., Brothers, L. and Davies, J.N. (1981): Sympathetic noradrenergic sprouting in response to central cholinergic denervation : A histochemical study of neuronal sprouting in the rat hippocampal formation. *Brain. Res.* 210: 115-128
- Cunningham, T.J. (1982): Naturally occurring neuron death and its regulation by developing neural pathways. *Int. Rev. Cytol.* 74: 163-186
- Cunningham, T.J., Mohler, I.M. and Giordano, D.L. (1982): Naturally occurring neuron death in the ganglion cell layer of the neonatal rat : morphology and evidence for regional correspondence with neuron death in *superior colliculus*. *Dev. Brain Res.* 2: 203-215
- Dahl, D., Bignami, A., Weber, K. and Osborn, M. (1981): Filament proteins in rat optic nerves undergoing Wallerian degeneration : localization of vimentin, the fibroblastic 100S protein, in normal and reactive astrocytes. *Exp. Neurol.* 73: 496-506

- DaPrada, M., Keller, H.H., Pieri, L., Kettler, R. and Haefely, W.E. (1984): The pharmacology of Parkinson's disease : basic aspects and recent advances. *Experientia* 40: 1165-1172
- Davies, J.D., Young, E.W., Mera, S.L. and Bernard, K. (1983): Lysozyme is a component of human vascular fibers. *Experientia* 39: 382-383
- Detwiler, S.R. (1920): On the hyperplasia of nerve centers resulting from excessive overloading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6: 96-101
- DiLorenzo, N., Palma, L. and Ferrante, L. (1977): Cerebrospinal fluid lysozyme activity in patients with central nervous system tumours. *Neurochir.* 20: 19-22
- Divac, I. (1975): Magnocellular nuclei of the basal fore-brain project to *neocortex*, brainstem, and olfactory bulb. Review of some functional correlates. *Brain Res.* 93: 385-398
- Dreyfus, C.F., Peterson, E.R. and Crain, S.M. (1980): Failure of nerve growth factor to affect fetal mouse brainstem catecholaminergic neurons in culture. *Brain Res.* 194: 540-547
- Duffy, P.E. (1983): *Astrocytes : Normal, Reactive, and Neoplastic*. Raven Press, New York; 224 S.
- Dumas, M., Schwab, M.E. and Thoenen, H. (1979): Retrograde transport of specific macromolecules as a tool for characterizing nerve terminal membranes. *J. Neurobiol.* 10: 179-198
- Eagleson, K.L., Raju, T.R. and Bennett, M.R. (1985): Motoneurone survival is induced by immature astrocytes from developing avian spinal cord. *Dev. Brain Res.* 17: 95-104
- Ebendal, T., Olson, L. and Seiger, A. (1983): The level of nerve growth factor (NGF) as a function of innervation. A correlative radio-immunoassay and bioassay study of the rat iris. *Exp. Cell. Res.* 148: 311-317
- Eckenstein, F. and Sofroniew, M. (1983): Identification of central cholinergic neurons containing both choline acetyltransferase and acetylcholinesterase and of central neurons containing only acetylcholinesterase. *J. Neurosci.* 3: 2286-2291
- Eckenstein, F. and Thoenen, H. (1983): Cholinergic neurons in rat *neocortex* demonstrated by immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neurosci. Lett.* 36: 211-215

- Gekle, D., Kult, J. and Roth, R. (1977): Lysozym und β_2 -Makroglobulin im Liquor gesunder Kinder und bei Kindern mit Erkrankungen des Zentralnervensystems. *Klin. Woch.schr.* 55: 189-191
- Ghandour, M.S., Langley, O.K. and Clos, J. (1983): Immunohistochemical and biochemical approaches to the development of neuroglia in the CNS, with special reference to the *cerebellum*. *Int. J. Devl. Neurosci.* 1: 411-425
- Gnahn, H., Hefti, F., Heumann, R., Schwab, M.E. and Thoenen, H. (1983): NGF-mediated increase of choline acetyltransferase (ChAT) in the neonatal rat forebrain; evidence for a physiological role of NGF in the brain? *Dev. Brain Res.* 9: 45-52
- Goedert, M., Otten, U., Hunt, S.P., Bond, J., Chapman, D. and Lichtensteiger, W. (1984): Biochemical and anatomical effects of antibodies against NGF on developing rat sensory ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1580-1584
- Goedert, M., Otten, U., Schaefer, T., Schwab, M. and Thoenen, H. (1980): Immunosympathectomy: lack of evidence for a complement-mediated cytotoxic mechanism. *Brain Res.* 189: 157-168
- Goedert, M., Otten, U. and Thoenen, H. (1978): Biochemical effects of antibodies against nerve growth factor on developing and differentiated sympathetic ganglia. *Brain Res.* 148: 264-268
- Gorin, P.D. and Johnson, E.M. Jr. (1979): Experimental autoimmune model of nerve growth factor deprivation: effects on peripheral sympathetic and sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5382-5386
- Gorin, P.D., and Johnson, E.M. Jr. (1980): Effects of long-term nerve growth factor deprivation on the nervous system of the adult rat: an experimental autoimmune approach. *Brain Res.* 198: 27-42
- Greene, L.A. (1977): A quantitative bioassay for nerve growth factor (NGF) activity employing a clonal pheochromocytoma cell line. *Brain Res.* 133: 350-353
- Greene, L.A. and Rukenstein, A. (1981): Regulation of acetylcholinesterase activity by nerve growth factor: role of transcription and dissociation from effects of proliferation and neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 256: 6363-6367
- Greene, L.A. and Shooter, E.M. (1980): The nerve growth factor: biochemistry, synthesis and mode of action. *Ann. Rev. Neurosci.* 3: 353-402

- Guroff, G. (1983): Nerve growth factor and other factors acting on the nervous system. In: A. Lajtha (ed.) : *Handbook of Neurochemistry* (2nd ed.); Plenum Press, New York; Vol. 5; pp 443-466
- Guth, L. and Watson, P.K. (1968): A correlated histochemical and quantitative study on cerebral glycogen after brain injury. *Exp. Neurol.* 22: 590-602
- Hamburger, V. (1934): The effect of wing bud extirpation on the development of the central nervous system in chick embryos. *J. Exp. Zool.* 68: 449-494
- Hamburger, V. (1939): Motor and sensory hyperplasia following limb-bud transplantations in chick embryos. *Physiol. Zool.* 12: 268-284
- Hamburger, V. (1975): Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* 160: 535-546
- Hamburger, V. and Levi-Montalcini, R. (1949): Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 111: 457-502
- Hamburger, V., Brunso-Bechtold, J.K. and Yip, J.W. (1981): Neuronal death in the spinal ganglia of the chick embryo and its reduction by nerve growth factor. *J. Neurosci.* 1: 60-71
- Hansson, E. (1983): Accumulation of putative amino acid transmitters, monoamines, and D-Ala²-Met-enkephalinamide in primary astroglial cultures from various brain areas, visualized by autoradiography. *Brain Res.* 289: 189-196
- Harper, G.P. and Thoenen, H. (1980): Nerve growth factor : biological significance, measurement, and distribution. *J. Neurochem.* 34: 5-16
- Harper, G.P. and Thoenen, H. (1981): Target cells, biological effects, and mechanism of action of nerve growth factor and its antibodies. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 21: 205-229
- Harper, G.P., Barde, Y.-A., Edgar, D., Ganten, D., Hefti, F., Heumann, R., Naujoks, K.W., Rohrer, H., Turner, J.E. and Thoenen, H. (1983): Biological and immunological properties of the nerve growth factor from bovine seminal plasma : comparison with the properties of mouse nerve growth factor. *Neuroscience* 8: 375-387
- Hartgraves, S.L., Mensah, P.L. and Kelly, P.H. (1982): Regional decreases of cortical choline acetyltransferase after lesions of the septal area and in the area of *nucleus basalis magnocellularis*. *Neuroscience* 7: 2269-2276

- Hartman, B.K., Agrawal, H.C., Kalmbach, S. and Shearer, W.T. (1979): A comparative study of the immunohistochemical localization of basic protein to myelin and oligodendrocytes in rat and chicken brain. *J. Comp. Neurol.* 188: 273-290
- Hatanaka, H., Otten, U. and Thoenen, H. (1978): Nerve growth factor mediated selective induction of ornithine decarboxylase in rat pheochromocytoma; a cyclic AMP-independent process. *FEBS Lett.* 92: 313-316
- Hawkes, R., Niday, E. and Gordon, J. (1982): A dot immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Analyt. Biochem.* 119: 142-147
- Hayashi, M., Edgar, D., Thoenen, H. (1985): Nerve growth factor changes the relative levels of neuropeptides in developing sensory and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Dev. Biol.* 108: 49-55
- Hefti, F., Dravid, A. and Hartikka, J. (1984): Chronic injections of nerve growth factor elevate hippocampal choline acetyltransferase activity in adult rats with partial septo-hippocampal lesions. *Brain Res.* 293: 305-311
- Hefti, F., Gnahn, H., Schwab, M.E. and Thoenen, H. (1982): Induction of tyrosine hydroxylase (TH) by nerve growth factor and by elevated K⁺-concentrations in cultures of dissociated sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 2: 1554-1566
- Henderson, Z. (1981): A projection from acetylcholinesterase-containing neurons in the diagonal band to the occipital cortex of the rat. *Neuroscience* 6: 1081-1088
- Hendry, I.A. (1977): Cell division in the developing sympathetic nervous system. *J. Neurocytol.* 6: 299-309
- Hendry, I.A. and Campbell, J. (1976): Morphometric analysis of rat superior cervical ganglion after axotomy and nerve growth factor treatment. *J. Neurocytol.* 5: 351-360
- Herrup, K. and Shooter, E.M. (1975): Properties of the β -nerve growth factor receptor in development. *J. Cell Biol.* 67: 118-125
- Hertz, L. (1982): Astrocytes. In: A. Lajtha (ed.) : *Handbook of Neurochemistry* (2nd ed.); Plenum Press, New York; Vol. 1: 319-355
- Heumann, R., Korsching, S., Scott, J. and Thoenen, H. (1984): Relationship between levels of nerve growth factor (NGF) and its messenger RNA in sympathetic ganglia and peripheral target tissues. *EMBO J.* 3: 3183-3189

- Heumann, R., Schwab, M.E. and Thoenen, H. (1981): A second messenger required for nerve growth factor biological activity ? *Nature (Lond.)* 292: 838-840
- Hill, M.A. and Bennett, M.R. (1983): Cholinergic growth factor from skeletal muscle elevated following denervation. *Neurosci. Lett.* 35: 31-36
- Hogue-Angeletti, R.H. and Bradshaw, R.A. (1979): Nerve growth factors in snake venoms. In: C.-Y. Lee (ed.) : *Handbook of Experimental Pharmacology*; Springer Verl., Berlin; 52: pp 276-294
- Hollyday, M. and Hamburger, V. (1976): Reduction of the naturally occurring motor neuron loss by enlargement of the periphery. *J. Comp. Neurol.* 170: 311-320
- Honegger, P. and Lenoir, D. (1982): Nerve growth factor (NGF) stimulation of cholinergic telencephalic neurons in aggregating cell cultures. *Dev. Brain Res.* 3: 229-238
- Houser, C.R., Crawford, G.D., Barber, R.P., Salvaterra, P.M. and Vaughn, J.E. (1983): Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons : an immunocytochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *Brain Res.* 266: 97-119
- Jacobowitz, D.M. and Creed, G.J. (1983): Cholinergic projection sites of the nucleus of *tractus diagonalis*. *Brain Res. Bull.* 10: 365-371
- Javoy-Agid, F., Ruberg, M., Taquet, H., Bokobza, B., Agid, Y., Gaspar, P., Berger, B., N'Guyen-LeGros, J., Alvarez, C., Gray, F., Escourolle, R., Scatton, B. and Rouquier, L. (1984): Biochemical neuropathology of Parkinson's disease. In: R.G. Hassler and J.F. Christ (ed.) : *Advances in Neurology*; Raven Press, New York; 40: pp 189-198
- Jeffery, G. (1984): Retinal ganglion cell death and terminal field retraction in the developing rodent visual system. *Dev. Brain Res.* 13: 81-96
- Johnson, E.M. Jr., Andres, R.Y. and Bradshaw, R.A. (1978): Characterization of the retrograde transport of nerve growth factor (NGF) using high specific activity (125 I)NGF. *Brain Res.* 150: 319-331
- Johnson, E.M. Jr., Gorin, P.D., Brandeis, L.D. and Pearson, J. (1980): Dorsal root ganglion neurons are destroyed by exposure *in utero* to maternal antibody to nerve growth factor. *Science* 210: 916-918

- Johnson, E.M. Jr., Osborne, P.A., Rydel, R.E., Schmidt, R.E. and Pearson, J. (1983): Characterization of the effects of autoimmune nerve growth factor deprivation in the developing guinea pig. *Neuroscience* 8: 631-642
- Johnston, M.V., McKinney, M. and Coyle, J.T. (1981): *Neocortical* cholinergic innervation: a description of extrinsic and intrinsic components in the rat. *Exp. Brain Res.* 43: 159-172
- Jollès, P. and Jollès, J. (1984): What's new in lysozyme research? - Always a model system, today as yesterday. *Mol. Cell. Biochem.* 63: 165-189
- Katz, M.J. and Lasek, R. (1980): Guidance cue patterns and cell migration in multicellular organisms. *Cell Motility*: A. Liss, New York; 1: 141-157
- Katz, M.J., Lasek, R.J. and Silver, J. (1983): Ontophylogenetics of the nervous system: development of the *corpus callosum* and evolution of axon tracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5936-5940
- Kessler, J.A. and Black, I.B. (1980a): The effects of nerve growth factor (NGF) and antiserum to NGF on the development of embryonic sympathetic neurons *in vivo*. *Brain Res.* 189: 157-168
- Kessler, J.A. and Black, I.B. (1980b): Nerve growth factor stimulates the development of substance P in sensory ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 649-652
- Kimura, H., McGeer, P.L., Peng, J.H. and McGeer, E.G. (1981): The central cholinergic system studied by choline acetyltransferase immunohistochemistry in the cat. *J. Comp. Neurol.* 200: 151-201
- Koenig, E. (1984): Local synthesis of axonal protein. In: A. Lajtha (ed.): *Handbook of Neurochemistry* (2nd ed.); Plenum Press, New York; Vol. 7: pp 315-340
- König, J.F.R. and Klippel, R.A. (1974): *The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem*. Robert E. Krieger, Huntington, New York; reprint.
- Koeppen, A.H. (1985): Wallerian degeneration. In: A. Lajtha (ed.): *Handbook of Neurochemistry* (2nd ed.); Plenum Press, New York; Vol. 9: pp 443-506
- Konkol, R.J., Mailman, R.B., Bendeich, E.G., Garrison, A.M., Mueller, R.A. and Breese, G.R. (1978): Evaluation of the effects of nerve growth factor and anti-nerve growth factor on the development of central catecholamine-containing neurons. *Brain Res.* 144:

- Korsching, S. and Thoenen, H. (1983a): Nerve growth factor in sympathetic ganglia and corresponding target organs of the rat: correlation with density of sympathetic innervation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3513-3516
- Korsching, S. and Thoenen, H. (1983b): Quantitative demonstration of the retrograde axonal transport of endogenous nerve growth factor. *Neurosci. Lett.* 39: 1-4
- Korsching, S., Auburger, G., Heumann, R., Scott, J. and Thoenen, H. (1985): Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation. *EMBO J.* *in press*
- Krieg, W.J.S. (1946): Connections of the cerebral cortex. I. The albino rat. A. Topography of the cortical areas. *J. Comp. Neurol.* 84: 221-275
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T 4. *Nature (Lond.)* 227: 680-685
- Lamour, Y., Dutar, P. and Jobert, A. (1984): Cortical projections of the nucleus of the diagonal band of *Broca* and of the *substantia innominata* of the rat: an anatomical study using the anterograde transport of a conjugate of wheat germ agglutinin and horseradish peroxidase. *Neuroscience* 12: 395-408
- Landis, D.M.D. and Reese, T.S. (1982): Regional organization of astrocytic membranes in cerebellar cortex. *Neuroscience* 7: 937-950
- Landmesser, L. (1980): The generation of neuromuscular specificity. *Ann. Rev. Neurosci.* 3: 279-302
- Landmesser, L. and Pilar, G. (1976): Fate of ganglionic synapses and ganglion cell axons during normal and induced cell death. *J. Cell Biol.* 68: 357-374
- Latov, N., Nilaver, G., Zimmermann, E.A., Johnson, W.G., Silverman, A.-J., Defendini, R. and Cote, L. (1979): Fibrillary astrocytes proliferate in response to brain injury. *Dev. Biol.* 72: 381-384
- Letourneau, P.C. (1978): Chemotactic response of nerve elongation to nerve growth factor. *Dev. Biol.* 66: 183-196
- Levey, A.I., Wainder, B.H., Rye, D.B., Mufson, E.J., Mesulam, M.-M. (1984): Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons intrinsic to rodent cortex and distinction from acetylcholinesterase-positive neurons. *Neuroscience* 13: 341-353

- Levi, G., Wilkin, G.P., Ciotti, M.T. and Johnstone, S. (1983): Enrichment of differentiated, stellate astrocytes in cerebellar interneuron cultures as studied by GFAP immunofluorescence and autoradiographic uptake patterns of (^3H)D-aspartate and (^3H)GABA. *Dev. Brain Res.* 10: 227-241
- Levi-Montalcini, R. and Angeletti, P.U. (1966): Immuno-sympathectomy. *Pharmakol. Rev.* 48: 534-569
- Levi-Montalcini, R. and Hamburger, V. (1951): Selective growth-stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 116: 321-362
- Levi-Montalcini, R. and Hamburger, V. (1953): A diffusible agent of mouse sarcoma producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J. Exp. Zool.* 123: 233-278
- Levi-Montalcini, R., Aloe, L., Mugnaini, A., Oesch, F. and Thoenen, H. (1975): Nerve growth factor induces volume increase and enhances tyrosine hydroxylase synthesis in chemically axotomized sympathetic ganglia of newborn rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 595-599
- Levi-Montalcini, R., Meyer, H., and Hamburger, V. (1954): *In vitro* experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Cancer Res.* 14: 49-57
- Levitt, P., and Rakic, P. (1980): Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing monkey brain. *J. Comp. Neurol.* 193: 815-840
- Levitt, P., Cooper, M.L. and Rakic, P. (1981): Coexistence of neuronal and glial precursor cells in the cerebral ventricular zone of the fetal monkey: an ultrastructural immunoperoxidase analysis. *J. Neurosci.* 1: 27-39
- Levitt, P., Cooper, M.L. and Rakic, P. (1983): Early divergence and changing proportions of neuronal and glial precursor cells in the primate cerebral ventricular zone. *Dev. Biol.* 96: 472-484
- Lindsay, R.M. (1979): Adult rat brain astrocytes support survival of both NGF-dependent and NGF-independent neurons. *Nature (Lond.)* 282: 80-82
- Lindsay, R.M. and Tarbit, J. (1979): Developmentally regulated induction of neurite outgrowth from immature chick sensory neurons (drg) by homogenates of avian or mammalian heart, liver and brain. *Neurosci. Lett.* 12: 195-200

- Lindsay, R.M., Barber, P.C., Sherwood, M.R.C., Zimmer, J. and Raisman, G. (1982): Astrocyte cultures from adult rat brain. Derivation, characterization and neurotrophic properties of pure astroglial cells from *corpus callosum*. *Brain Res.* 243: 329-343
- Longo, F.M., Manthorpe, M. and Varon, S. (1982): Spinal cord neuronotrophic factors (SCNTFs): 1. Bioassay of Schwannoma and other conditioned media. *Dev. Brain Res.* 3: 277-294
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- Loy, R. and Moore, R.Y. (1977): Anomalous innervation of the hippocampal formation by peripheral sympathetic axons following mechanical injury. *Exp. Neurol.* 57: 645-650
- Lund-Andersen, H. (1979): Transport of glucose from blood to brain. *Physiol. Rev.* 59: 305-352
- Manthorpe, M., Luyten, W., Longo, F.M. and Varon, S. (1983): Endogenous and exogenous factors support neuronal survival and choline acetyltransferase activity in embryonic spinal cord cultures. *Brain Res.* 267: 57-66
- Marchbanks, R.M. (1982): Biochemistry of Alzheimer's Dementia. *J. Neurochem.* 39: 9-15
- Mayo, W., Dubois, B., Ploska, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., LeMoal, M. and Simon, H. (1984): Cortical projections from the basal forebrain of the rat, with special reference to the prefrontal *cortex* innervation. *Neurosci. Lett.* 47: 149-154
- McAllister, L., Scheller, R.H., Kandel, E.R. and Axel, R. (1983): *In situ* hybridization to study the origin and fate of identified neurons. *Science* 222: 800-808
- McCaffery, C.A., Raju, T.R. and Bennett, M.R. (1984): Effects of cultured astroglia on the survival of neonatal retinal ganglion cells *in vitro*. *Dev. Biol.* 104: 441-448
- McKinney, M., Coyle, J.T. and Hedreen, J.C. (1983): Topographic analysis of the innervation of the rat *neocortex* and *hippocampus* by the basal forebrain system. *J. Comp. Neurol.* 217: 103-121

- Menesini Chen, M.G., Chen, J.S. and Levi-Montalcini, R. (1978): Sympathetic nerve fibers ingrowth in the central nervous system of neonatal rodents upon intracerebral NGF injections. *Arch. Ital. Biol.* 116: 53-84
- Mesulam, M.-M., Mufson, E.J., Levey, A.I. and Wainer, B.H. (1983a): Cholinergic innervation of *cortex* by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, *nucleus basalis (substantia innominata)*, and *hypothalamus* in the Rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 214: 170-197
- Mesulam, M.-M., Mufson, E.J., Levey, A.I. and Wainer, B.H. (1984): Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brainstem of the macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. *Neuroscience* 12: 669-686
- Mesulam, M.-M., Mufson, E.J., Weinert, B.H. and Levey, A.I. (1983b): Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch 1 - Ch 6). *Neuroscience* 10: 1185-1201
- Hiller, M.S., Buck, S.H., Sipes, I.G., Yamamura, H.I. and Burks, T.F. (1982): Regulation of substance P by nerve growth factor: disruption by capsaicin. *Brain Res.* 250: 193-196
- Müller, H.W., Beckh, S. and Seifert, W. (1984): Neurotrophic factor for central neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1248-1252
- Mugnaini, E. (1982): Membrane specializations in neuroglial cells and at neuron-glia contacts. In: T.A. Sears (ed.): *Neuronal-glia cell interrelationships*; Dahlem Konf.; Springer Verl., Berlin, Heidelberg, New York; pp 39-56
- Murphy, R.A., Oger, J., Saide, J.D., Blanchard, M.H., Arnason, G.W., Hogan, Ch. Pantazis, N.J. and Young, M. (1977): Secretion of nerve growth factor by central nervous system glioma cells in culture. *J. Cell Biol.* 72: 769-773
- Nieto-Sampedro, M., Lewis, E.R., Cotman, C.W., Manthorpe, M., Skaper, S.D., Barbin, G., Longo, F.M. and Varon, S. (1982): Brain injury causes a time-dependent increase in neurotrophic activity at the lesion site. *Science* 217: 860-861
- Nieto-Sampedro, M., Manthorpe, M., Barbin, G., Varon, S., and Cotman, C.W. (1983): Injury-induced neurotrophic activity in adult rat brain: correlation with survival of delayed implants in the wound cavity. *J. Neurosci.* 3: 2219-2228

- Nieto-Sampedro, M., Whittemore, S.R., Needels, D.L., Larson, J. and Cotman, C.W. (1984): The survival of brain transplants is enhanced by extracts from injured brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6250-6254
- Nurcombe, V. and Bennett, M.R. (1981): Embryonic chick retinal ganglion cell identified "*in vitro*": - Their survival is dependent on a factor from the optic tectum. *Exp. Brain Res.* 44: 249-258
- Olson, L. and Seiger, A. (1976): *Locus coeruleus* : fibre growth regulation *in oculo*. *Med. Biol.* 54: 142-145
- Olson, L., Ebendal, T. and Seiger, A. (1979): NGF and anti-NGF : evidence against effects on fiber growth in *locus coeruleus* from cultures of perinatal CNS tissues. *Dev. Neurosci.* 2: 160-176
- Oppenheim, R.W. (1981): Neuronal cell death and some related regressive phenomena during neurogenesis : a selective historical review and progress report. In: W.M. Cowan (ed.) : *Studies on Developmental Neurobiology : Essays in Honor of Victor Hamburger*; Oxford Press, London & New York: pp 74-133
- Otten, U. and Lorez, H.P. (1983): Nerve growth factor increases substance P, cholecystikinin and vasoactive intestinal polypeptide immunoreactivities in primary sensory neurones of newborn rats. *Neurosci. Lett.* 34: 153-158
- Otten, U., Schwab, M., Gagnon, C. and Thoenen, H. (1977): Selective induction of tyrosine hydroxylase and dopamine- β -hydroxylase by nerve growth factor : comparison between adrenal medulla and sympathetic ganglia of adult and newborn rats. *Brain Res.* 133: 291-303
- Palay, S.L. and Chan-Palay, V. (1974): *Cerebellar Cortex* : Cytology and Organization. Springer Verl., New York: 348 p.
- Patterson, P. (1978): Environmental determination of autonomic neurotransmitter functions. *Ann. Rev. Neurosci.* 1: 1-19
- Pearson, R.C.A., Gatter, K.C. and Powell, T.P.S. (1983): The cortical relationships of certain basal ganglia and the cholinergic basal forebrain nuclei. *Brain Res.* 261: 327-330
- Penney, J.B. Jr. and Young, A.B. (1983): Speculations on the functional anatomy of basal ganglia disorders. *Ann. Rev. Neurosci.* 6: 73-94

- Peters, A., Palay, S.L. and Webster, H. de F. (1976): **The Fine Structure of the Nervous System : The neurons and supporting cells.** W.B.Saunders & Co., Philadelphia: 406 S.
- Pixley, S.K.R. and DeVellis, J. (1984): Transitions between immature radial glia and mature astrocytes studied with a monoclonal antibody to vimentin. *Dev. Brain Res.* 15: 201-209
- Politis, M.J. (1985): Tropic factors in reactive mammalian central nervous system tissue. *Brain Res.* 328: 277-281
- Politis, M.J. and Houle, J.D. (1985): Effects of cytosine arabinoside (AraC) on reactive gliosis *in vivo*. An immunohistochemical and morphometric study. *Brain Res.* 328: 291-300
- Politis, M.J., Pellegrino, R.G., Oaklander, A.L. and Ritchie, J.M. (1983): Reactive glial protein synthesis and early disappearance of saxitoxin binding in degenerating rat optic nerve. *Brain Res.* 273: 392-395
- Potts, R.A., Dreher, B. and Bennett, M.R. (1982): The loss of ganglion cells in the developing *retina* of the rat. *Dev. Brain Res.* 3: 481-486
- Price, J.T. and Stern, R. (1983): Individual cells in the *nucleus basalis* - diagonal band complex have restricted axonal projections to the cerebral *cortex*. *Brain Res.* 269: 352-356
- Privat, A., Valat, J. and Fulcrand, J. (1981): Proliferation of neuroglial cell lines in the degenerating optic nerve of young rats. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 40: 46-60
- Purves, D. and Lichtman, J.W. (1983): Specific connections between nerve cells. *Ann. Rev. Physiol.* 45: 553-565
- Raine, C.S. (1984): On the association between perinodal astrocytic processes and the node of Ranvier in the C.N.S. *J. Neurocytol.* 13: 21-27
- Raju, T., Bignami, A. and Dahl, D. (1981): *In vivo* and *in vitro* differentiation of neurons and astrocytes in the rat embryo. Immunofluorescent study with neurofilament and glial filament antisera. *Dev. Biol.* 85: 344-357
- Rakic, P. (1971): Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar *cortex*. A Golgi and electron microscopic study in Macacus rhesus. *J. Comp. Neurol.* 141: 283-312

- Rakic, P. (1982): The role of neuronal-glial cell interaction during brain development. In: T.A. Sears (ed.) : *Neuronal-glial Cell Interrelationships*; Springer Verl., New York; pp 25-38
- Reichardt, L.F. (1984): Immunological approaches to the nervous system. *Science* 225: 1294-1299
- Reisert, I., Wildemann, G., Grab, D. and Pilgrim, Ch. (1984): The glial reaction in the course of axon regeneration: a stereological study of the rat hypoglossal nucleus. *J. Comp. Neurol.* 229: 121-128
- Rohrer, H. and Barde, Y.-A. (1982): Presence and disappearance of nerve growth factor receptors on sensory neurons in culture. *Dev. Biol.* 89: 309-315
- Rohrer, H., Otten, U. and Thoenen, H. (1978): On the role of RNA synthesis in the selective induction of tyrosine hydroxylase by nerve growth factor. *Brain Res.* 159: 436-439
- Rohrer, H., Thoenen, H. and Edgar, D. (1983): Presence of nerve growth factor receptors and catecholamine uptake in subpopulations of chick sympathetic neurons: correlation with survival factor requirements in culture. *Dev. Biol.* 99: 34-40
- Ross, M.E., Park, D.H., Teitelman, G., Pickel, V.M., Reis, D.J. and Joh, T.H. (1983): Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase using a monoclonal antibody: a radioautographic method. *Neuroscience* 10: 907-922
- Rutishauser, U. (1984): Developmental biology of a neural cell adhesion molecule. *Nature (Lond.)* 310: 549-554
- Rye, D.E., Wainer, B.H., Mesulam, M.-M., Mufson, E.J. and Saper, C.B. (1984): Cortical projections arising from the basal forebrain: a study of cholinergic and noncholinergic components employing combined retrograde tracing and immunohistochemical localization of choline acetyltransferase. *Neuroscience* 13: 627-643
- Schmechel, D.E. and Rakic, P. (1979): A Golgi study of radial glial cells in the developing monkey *telencephalon*: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat. Embryol.* 156: 115-152
- Schnaar, R.L. and Schaffner, A.E. (1981): Separation of cell types from embryonic chick and rat spinal cord: characterization of motoneuron-enriched fractions. *J. Neurosci.* 1: 204-217

- Schnitzer, J., Kim, S.U. and Schachner, M. (1984): Some immature tetanus toxin-positive cells share antigenic properties with subclasses of glial cells. An immunofluorescence study in the developing nervous system of the mouse using a new monoclonal antibody S1. *Dev. Brain Res.* 16: 203-217
- Schucker, F. (1972): Effects of NGF-antiserum in sympathetic neurons during early postnatal development. *Exp. Neurol.* 36: 59-78
- Schwab, M.E. and Thoenen, H. (1983): Retrograde axonal transport. In: A. Lajtha (ed.) : *Handbook of Neurochemistry* (2nd ed.); Plenum Press, New York; Vol. 5; pp 381-404
- Schwab, M.E. and Thoenen, H. (1985): Dissociated neurons regenerate into sciatic but not optic nerve explants in culture irrespective of neurotrophic factors. *J. Neurosci.* *in press*
- Schwab, M.E., Heumann, R. and Thoenen, H. (1981): Communication between target organs and nerve cells : retrograde axonal transport and site of action of nerve growth factor. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 46: 125-134
- Schwab, M.E., Otten, U., Agid, Y. and Thoenen, H. (1979): Nerve growth factor (NGF) in the rat CNS : absence of specific retrograde axonal transport and tyrosine hydroxylase induction in *locus coeruleus* and *substantia nigra*. *Brain Res.* 168: 473-483
- Schwartz, J.P., Pearson, J. and Johnson, E.M. Jr. (1982): Effect of exposure to anti-NGF on sensory neurons of adult rats and guinea pigs. *Brain Res.* 244: 378-381
- Schwartz, M., Mizrachi, Y. and Eshhar, N. (1982): Factor(s) from goldfish brain induce neuritic outgrowth from explanted regenerating *retina*. *Dev. Brain Res.* 3: 29-35
- Seeley, P.J., and Greene, L.A. (1983): Short-latency local actions of nerve growth factor at the growth cone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2789-2793
- Sensenbrenner, M., Jaros, G.G., Mooney, G. and Meyer, B.J. (1980): Effect of conditioned media on nerve cell differentiation. *Experientia* 36: 660-662
- Shelton, D.L. and Reichardt, L.F. (1984): Expression of the β -nerve growth factor gene correlates with the density of sympathetic innervation in effector organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7951-7955

- Shute, C.C.D. and Lewis, P.R. (1967): The ascending cholinergic reticular system: neocortical, olfactory and subcortical projections. *Brain* 90: 497-520
- Silver, J., Lorenz, S.E., Wahlsten, D. and Coughlin, J. (1982): Axonal guidance during development of the great commissures: descriptive and experimental studies, *in vivo*, on the role of preformed glial pathways. *J. Comp. Neurol.* 210: 10-29
- Skoff, R.P. (1975): The fine structure of pulse-labeled ^3H -thymidine cells in degenerating rat optic nerve. *J. Comp. Neurol.* 161: 595-612
- Skoff, R.P., Price, D.L. and Stocks, A. (1976): Electron microscopic autoradiographic studies of gliogenesis in rat optic nerve. - II. Time of origin. *J. Comp. Neurol.* 169: 313-334
- Smart, I. and Leblond, C.P. (1961): Evidence for division and transformation of neuroglia cells in the mouse brain as derived from radioautography after injection of thymidine- H^3 . *J. comp. Neurol.* 116: 349-367
- Sofroniew, M.V., Eckenstein, F., Thoenen, H. and Cuello, A.C. (1982): Topography of choline acetyltransferase-containing neurons in the forebrain of the rat. *Neurosci. Lett.* 33: 7-12
- Stach, R.W. and Rusenko, K.W. (1984): Covalent attachment of ^{125}I - β nerve growth factor to its receptor on sympathetic neurons. *J. Neurosci. Res.* 11: 215-229
- Stöckel, K., Gagnon, C., Guroff, G. and Thoenen, H. (1976): Purification of nerve growth factor by affinity chromatography. *J. Neurochem.* 26: 1207-1211
- Stöckel, K., Paravicini, U. and Thoenen, H. (1974): Specificity of the retrograde axonal transport of nerve growth factor. *Brain Res.* 76: 413-421
- Stöckel, K., Schwab, M. and Thoenen, H. (1975): Comparison between the retrograde axonal transport of nerve growth factor and tetanus toxin in motor, sensory and adrenergic neurons. *Brain Res.* 99: 1-16
- Suda, K., Barde, Y.-A. and Thoenen, H. (1978): Nerve growth factor in mouse and rat serum: correlation between bioassay and radioimmunoassay determinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4042-4046
- Sutter, A., Riopelle, R.J., Harris-Warrick, R.M. and Shooter, E.M. (1979): Nerve growth factor receptors: characterization of two distinct classes of binding sites on chick embryo sensory ganglia cells. *J. Biol. Chem.* 254: 5972-5982

- Swarz, J.R. and Oster-Granite, M.L. (1978): Presence of radial glia in human foetal mouse *cerebellum*. *J. Neurocytol.* 7: 301-312
- Terry, R.D. and Davies, P. (1980): Dementia of the Alzheimer type. *Ann. Rev. Neurosci.* 3: 77-95
- Thoenen, H. and Barde, Y.-A. (1980): Physiology of nerve growth factor. *Physiol. Rev.* 60: 1284-1335
- Thoenen, H., Angeletti, P.U., Levi-Montalcini, R. and Kettler, R. (1971): Selective induction of tyrosine hydroxylase and dopamine- β -hydroxylase in the rat superior cervical ganglion by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 1598-1602
- Towbin, H., Stachlin, T. and Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354
- Turner, J.E., Barde, Y.-A., Schwab, M.E. and Thoenen, H. (1983): Extract from pig brain stimulates neurite outgrowth from fetal rat retinal explants. *Dev. Brain Res.* 6: 77-83
- Tytell, M. and Lasek, J.R. (1984): Glial polypeptides, transferred into the squid giant axon. *Brain Res.* 234: 223-232
- Unsicker, K., Krisch, B., Otten, U. and Thoenen, H. (1978): Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated adrenal chromaffin cells: impairment by glucocorticoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3498-3502
- Valentino, K.L., Jones, E.G. and Kane, S.A. (1983): Expression of GFAP immunoreactivity during development of long fiber tracts in the rat CNS. *Dev. Brain Res.* 2: 317-336
- Varon, S. and Adler, R. (1981): Trophic and specifying factors directed to neuronal cells. *Adv. Cell. Neurobiol.* 2: 115-163
- Varon, S. and Bunge, P. (1978): Trophic mechanisms in the peripheral nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* 1: 327-361
- Varon, S. and Sojmen, G. (1979): Neuron-glia interactions. *Neurosci. Res. Progr. Bull.* 17: 1-239
- Varon, S., Skaper, S.D., Barbin, G., Selak, I. and Manthorpe, M. (1984): Low molecular weight agents support survival of cultured neurons from the central nervous system. *J. Neurosci.* 4: 654-658

- Varon, S., Skaper, S.D. and Manthorpe, M. (1981): Trophic activities for dorsal root and sympathetic ganglionic neurons in media conditioned by Schwann and other peripheral cells. *Dev. Brain Res.* 1: 73-87
- Vaughn, J.E., Hinds, P.L. and Skoff, R.P. (1970): Electron microscopic studies of Wallerian degeneration in rat optic nerves. *J. Comp. Neurol.* 140: 175-206
- Walz, W., Wuttke, W. and Hertz, L. (1984): Astrocytes in primary cultures: membrane potential characteristics reveal exclusive potassium conductance and potassium accumulator properties. *Brain Res.* 292: 367-374
- Waxman, S.G. and Black, J.A. (1984): Freeze-fracture ultrastructure of the perinodal astrocyte and associated glial junctions. *Brain Res.* 308: 77-87
- Wendell-Smith, C.P., Blunt, M.J. and Baldwin, F. (1966): The ultrastructural characterization of macroglial cell types. *J. Comp. Neurol.* 127: 219-240
- Wenk, H., Bigl, V. and Meyer, U. (1980): Cholinergic projections from magnocellular nuclei of the basal forebrain to cortical areas in rats. *Brain Res. Rev.* 2: 295-316
- Whatley, S.A., Hall, C. and Lim, L. (1981): Hypothalamic neurons in dissociated cell culture: the mechanism of increased survival times in the presence of non-neuronal cells. *J. Neurochem.* 36: 2052-2056
- Wilkin, G.P., Levi, G., Johnstone, S.R. and Riddle, P.N. (1983): Cerebellar astroglial cells in primary culture: expression of different morphological appearances and different ability to take up (^3H)D-aspartate and (^3H)D-GABA. *Dev. Brain Res.* 10: 265-277
- Wolinsky, J.S., Jubelt, B., Burke, S. and Narayan, O. (1982): Hematogenous origin of the inflammatory response in acute poliomyelitis. *Ann. Neurol.* 11: 59-68
- Wolf, N.J., Eckenstein, F. and Butcher, L.L. (1983): Cholinergic projections from the basal forebrain to the frontal cortex: A combined fluorescent tracer and immunohistochemical analysis in the rat. *Neurosci. Lett.* 40: 93-98

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde unter Betreuung von Herrn Priv.Do. Dr. Martin Schwab am Max-Planck-Institut für Psychiatrie / Abteilung Neurochemie durchgeführt. Doktorvater war Herr Priv.Do. Dr. D.G. Weiss, dem ich hier für die kritische Durchsicht der Arbeit danken möchte.

Ich danke Herrn Prof. Thoenen für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten. Herrn Priv.Do. Dr. Martin Schwab möchte ich danken für die fortlaufende Betreuung der Arbeit und die weiterführenden Diskussionen. Herrn Dr. Y.-A. Barde möchte ich danken für die Überlassung der Antikörper und für seine methodisch-kritischen Hinweise, außerdem möchte ich ihm und Herrn Dr. H. Rohrer danken für die Überlassung von ^{125}I -NGF. Frau C. Čap und Frau C. Müller möchte ich danken für die Einweisung in Methoden der Zellkultur bzw. der Immunhistochemie. Schließlich möchte ich mich bei Frau C. Bauereiß für die Anfertigung der Zeichnungen bedanken.

LEBENS LAUF

Name : Magdalene Seiler

geboren am : 12. 9. 56 in : Eichstätt (Obb.)

Familienstand : ledig

Sept. 62 - Juli 66 : Besuch der Grundschulklassen 1 - 4 der
 evang. Grundschule Eichstätt

Sept. 66 - Feb. 69 : Besuch der Klassen 5 - 7 des musischen
 Gabrieli-Gymnasiums, Eichstätt

März 69 : Umzug nach München

März 69 - Mai 75 : Besuch der Klassen 7 - 13 des Theresien-
 Gymnasiums, München (neusprachl. Zweig)

Mai 75 : Abiturprüfung

Sept. 75 : Immatrikulation an der
 Ludwigs-Maximilians-Universität, München
 Studienrichtung : Biologie/Diplom

März/April 78 : Diplomvorprüfung
 (Zoologie, Chemie, Physik)

Okt./Nov. 80 : Diplomhauptprüfung
 (Zoologie, Biochemie, Anthropologie)

Dez. 80 - Apr. 82 : Diplomarbeit am Zool. Institut (Univ.)
 (Betreuer : Priv.Doiz. Dr. Achim Raab)
 Thema: "Hemmung₃ des schnellen axonalen
 Transports von ³H-markierten Proteinen
 durch Nocodazol"

Juni 82 : Diplom

Aug. 82 - Nov. 84 : Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für
 Psychiatrie/Abt. Neurochemie (Thoenen)
 (Betreuer : Priv.Doiz. Dr. M.E. Schwab,
 Doktorvater : Priv.Doiz. Dr. D.G. Weiss)
 Thema: "Regionale Verteilung, zelluläre
 Lokalisierung und neuronale Spezifität
 neurotrophischer Substanzen im Zentral-
 nervensystem von Maus und Ratte"

April 85 : Abgabe der Doktorarbeit

